

Signalmoleküle in der Regulation des Aktinzytoskeletts: Die Rolle von Nck bei WAVE-vermittelten Prozessen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Kai Städing
aus Braunschweig

1. Referent: Professor Dr. Jürgen Wehland

2. Referent: Professor Dr. Martin Korte

eingereicht am: 09.03.2009

mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.08.2009

Druckjahr: 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Weiß S.M., Ladwein M., Schmidt D., Ehinger J., Lommel S., Städing K., Beutling U., Disanza A., Frank R., Jänsch L., Scita G., Gunzer F., Rottner K., Stradal T.E.B.: IRSp53 links Tir to EspFU/N-WASP-mediated actin assembly in EHEC pedestal formation. *Cell Host & Microbe* 2009 (erscheint 19.03.2009)

Beutling U, Städing K, Stradal T, Frank R.: Large-scale analysis of protein-protein interactions using cellulose-bound peptide arrays. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008; 110:115-52. Review.

Tagungsbeiträge

Städing K., Fabian A., Rottner K., Stradal T.E.B.: Regulation of WASP/SCAR-proteins by Nck-SH3/Polyproline Interactions. (Vortrag) Schauinsland-Science-Weekend, Freiburg (2006)

Städing K., Fabian A., Rottner K., Stradal T.E.B.: Regulation of WASP/SCAR-proteins by SH3-domain containing adaptor proteins. (Poster) DGZ 6th Young Scientists Meeting "Cytoskeletal Dynamics", Heidelberg (2004)

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VI

1 Einleitung	1
1.1 Aktinpolymerisation	1
1.2 Das Mikrofilamentsystem	2
1.3 Regulation der Filamente durch Aktin-bindende Proteine	4
1.4 Der Arp2/3-Komplex	6
1.5 Die Interaktion von WASP/Scar-Proteinen mit dem Arp2/3-Komplex	7
1.5.1 WASP und N-WASP	8
1.5.2 WAVE1, WAVE2 und WAVE3	10
1.6 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf WASP/Scar-Proteine	13
1.7 Kleine GTPasen und deren Funktion im Mikrofilamentsystem	16
1.8 SH3-Domänen	17
1.9 Nck Adapterproteine	20
1.10 Abi1	22
1.11 Weitere SH3-Adaptoren	24
1.11.1 Eps8	24
1.11.2 IRSp53	25
1.12 Ena/VASP-Proteine	26
1.13 PAKs	28
1.14 Zielsetzung dieser Arbeit	29
2 Material und Methoden	32
2.1 Materialien	32
2.2 Bakterienstämme	32
2.3 Bakterienkulturmedien und Zusätze	32
2.4 Bakterienkulturbedingungen	33
2.5 Zellkultur	34
2.5.1 Medien und Lösungen	34
2.5.2 Verwendete Zelllinien	35
2.6 Molekularbiologische Methoden	36
2.6.1 Plasmide	36
2.6.2 Verwendete Oligonukleotide	38
2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion	39
2.6.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
2.6.5 Agarosegelelektrophorese	41
2.6.6 Southern Blot	42
2.6.6.1 Gewinnung von genomischer DNA aus ES-Zellen	42

2.6.6.2	Restriktionsverdau der genomischen DNA	43
2.6.6.3	Auftrennung der genomischen DNA auf Agarose-Gel	43
2.6.6.4	Depurinierung der genomischen DNA	43
2.6.6.5	Blotten	44
2.6.6.6	Markierung der Southern-Sonde	44
2.6.6.7	Inkubation der Membran mit der DNA-Sonde	45
2.6.6.8	Waschen und Analysieren der Membran	45
2.6.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	46
2.6.8	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	46
2.6.9	Ligation von DNA	47
2.6.10	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	47
2.6.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	48
2.6.11.1	Minipräparation	48
2.6.11.2	Midi- und Maxipräparation	48
2.6.12	Photometrische Quantifizierung von DNA	48
2.6.13	Mutagenese	48
2.6.14	DNA-Sequenzierung	49
2.7	Biochemische Methoden	50
2.7.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.7.2	Coomassie-Färbung	51
2.7.3	Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen	52
2.7.4	Konstruktion der Expressionsvektoren	52
2.7.5	Expression von Fusionsproteinen	53
2.7.6	Reinigung der GST-Fusionsproteine	53
2.7.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	54
2.7.8	GST-Pulldown	54
2.7.8.1	Immobilisierung der GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose	54
2.7.8.2	Aufschluss der transfizierten Zellen	55
2.7.8.3	GST-Pulldown	55
2.7.9	Immunpräzipitation (IP)	56
2.7.10	Western Blot	56
2.7.11	Immunfärbung der Chemoluminiszenz	57
2.7.11.1	Detektion der Chemoluminiszenz mittels Röntgenfilm	58
2.7.11.2	Detektion der Chemoluminiszenz mittels CCD-Kamera	58
2.7.12	Protein-Overlay Assay auf Objektträgern mit immobilisierten Peptiden	58
2.7.13	Generierung polyklonaler Antikörper	59
2.8	Zellbiologische Methoden	60
2.8.1	Standardkultur	60
2.8.2	Kultur auf Deckgläschen	60
2.8.3	Separation und Transfer	60
2.8.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	60

2.8.5	Transfektion eukaryotischer Zellen	61
2.8.6	Verhungern und Stimulieren von Zellen	61
2.8.7	Herstellung von Zellextrakten	62
2.8.8	Digitale Fluoreszenzmikroskopie	62
2.8.8.1	Immunfluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen	64
2.8.8.2	Antikörper-Hybridisierung	64
2.8.8.3	Phalloidin	65
2.8.9	Gene-targeting in embryonalen Stammzellen	65
2.8.9.1	Vorbereitung des targeting-Konstruktes auf die Elektroporation	65
2.8.9.2	Elektroporation	65
2.8.9.3	Selektion	66
2.8.9.4	„Klone picken“	66
2.8.10	Verwendete Konstrukte	67
2.8.11	Verwendete Antikörper	68
3	Ergebnisse	69
3.1	Ena/VASP-Proteine	69
3.1.1	Expression und Aufreinigung der GST-EVH1-Domänen	69
3.1.2	GST-Pulldowns mit isolierten GST-EVH1-Domänen	70
3.1.3	GST-Pulldowns von Ena/VASP-Proteinen mit isolierten SH3-Domänen	73
3.2	Biochemische Betrachtung der Interaktion von Nck mit dem WAVE-Komplex	76
3.2.1	Bindungsmotive der SH3-Domänen in WAVE-Komplex und N-WASP	76
3.2.2	Vorbereitung auf GST-Pulldowns und Immunpräzipitationen	85
3.2.2.1	Klonierung und Expression von GST-Fusionsproteinen	86
3.2.2.2	Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen Nck	86
3.2.2.3	Charakterisierung eines polyklonalen Antiserums gegen WAVE2	87
3.2.3	GST-Pulldowns	88
3.2.4	Immunpräzipitationen	91
3.2.5	IPs mit Nck-Mutanten	93
3.2.6	Auswirkung von PDGF auf die Nck/WAVE-Komplex-Interaktion	95
3.3	Betrachtung der Interaktion von Nck mit dem WAVE-Komplex in intakten Zellen	99
3.4	Herstellung eines konditionellen Abi1-k.o. in murinen ES-Zellen	105
4	Diskussion	108
4.1	Ena/VASP-Proteine	108
4.2	Biochemische Betrachtung der Interaktion von Nck mit dem WAVE-Komplex	111
5	Ausblick	115

6	Literaturverzeichnis	117
7	Abkürzungen	134
8	Danksagung	138

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1: Das Tretmühlenprinzip	2
Abb.1.2: Schematische Darstellung einiger Aktin-basierter Strukturen	3
Abb.1.3: 3-dimensionales Strukturmodell des Arp2/3-Komplexes	6
Abb.1.4: Domänenstrukturen der WASP/Scar-Proteine	8
Abb.1.5: N-WASP im autoinhibierten Zustand und im aktiven Zustand	10
Abb.1.6: Der WAVE-Komplex	11
Abb.1.7: 2 Modelle der Funktionsweise des WAVE-Komplexes	12
Abb.1.8: PDGFs und PDGF-Rezeptoren	13
Abb.1.9: Übersicht über die Signalwege unter Einfluss der PDGF-Rezeptoren	15
Abb.1.10: Der Rho-GTPasen-Zyklus	16
Abb.1.11: Oberflächenmodell einer SH3-Domäne	18
Abb.1.12: Domänenstruktur von Nck mit einigen bekannten Bindungspartnern	20
Abb.1.13: Aufbau eines „EPEC-pedestal“	21
Abb.1.14: Domänenstruktur von Abi1 mit einigen bekannten Bindungspartnern	23
Abb.1.15: Domänenstruktur der Ena/VASP-Proteine	27
Abb.1.16: Übersicht über die in der vorangegangenen Diplomarbeit erhobenen Daten	30
Abb.2.1: Plasmid-Karte des pGEX Fusionsvektors	36
Abb.2.2: Plasmid-Karte der pEGFP-C und pEGFP-N Fusionsvektoren	37
Abb.2.3: Plasmid-Karte des pIRES Vektors	37
Tab.2.1: Liste der verwendeten DNA-Konstrukte	67
Tab.2.2: Liste der verwendeten Antikörper und Markierungsreagenzien	68
Abb.3.1: Immobilisierte EVH1-Domänen nach Aufreinigung	70
Abb.3.2: GST-Pulldowns von GFP-Fusionsproteinen mit isolierten EVH1-Domänen	71
Abb.3.3: GST-Pulldowns mit VASP(AA1-116)	71
Dia.3.1: Mittlere gemessene Interaktionsstärken der EVH1-Domänen	72
Abb.3.4: GST-Pulldowns von Ena/VASP-Proteinen mit isolierten SH3-Domänen	73
Dia.3.2: Interaktionsstärken von Mena bzw. VASP mit verschiedenen SH3-Domänen	74
Abb.3.5: Ergebnisse der Pulldown-Experimente der Diplomarbeit	74
Abb.3.6: Netzwerk Polyprolin-basierter Interaktionen	75
Abb.3.7: Peptide Overlay Assays von Nck1 SH3-Domänen	76
Abb.3.8: Anordnung der Peptide auf den in der Endauswertung verwendeten Arrays	77
Abb.3.9: Peptide-array Interaktion mit 5µg/ml Nck1 SH3#2	78
Abb.3.10: Test-Arrays mit SH3-Domänen #1 und #3 von Nck1	79
Abb.3.11: Peptid-Muster der Test-Arrays in Abb.3.10	79
Tab.3.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Peptid-Scans	80

Abb.3.12: Peptide-Overlay Assay mit SH3-Domänen einiger Arp2/3-relevanter SH3-Adaptoren	81
Dia.3.3: Mittelwerte der Interaktionsstärken der ersten SH3-Domänen von Nck1 und Nck2	82
Dia.3.4: Mittelwerte der Interaktionsstärken der zweiten SH3-Domänen von Nck1 und Nck2	83
Dia.3.5: Mittelwerte der Interaktionsstärken der dritten SH3-Domänen von Nck1 und Nck2	84
Abb.3.13: PCR-Product Nck2	86
Abb.3.14: Test für α Nck Antikörper in der Immunpräzipitation	87
Abb.3.15: Antikörpertest pc α WAVE2 #1735 und #1736	87
Abb.3.16: Endogenes WAVE in GST-Pulldowns mit isolierten SH3-Domänen	88
Abb.3.17: Überexprimierte GFP-Polyprolin-Regionen von WASP/Scar-Proteinen und Abi1 in GST-Pulldowns mit Nck2	89
Abb.3.18: SH3-Adaptoren und WASP/Scar-Proteine in GST-Pulldowns mit Abi1-PP	90
Abb.3.19: Expression der verwendeten GFP-Konstrukte	90
Abb.3.20: Kopräzipitation von WAVE in IPs von ektopisch exprimierten GFP-Nck2 und GFP-Eps8	91
Abb.3.21: Immunpräzipitationen aus B16F1- und Hela- Zellen mit überexprimierten GFP-WAVE2 und Nck2	91
Abb.3.22: Sequenzierungen der Nck2-Mutanten im Vergleich mit Nck2 cDNA	94
Abb.3.23: Immunpräzipitationen von Nck2-Mutanten mit defekten SH3-Domänen	94
Abb.3.24: Phosphoryliertes und unphosphoryliertes WAVE im Western Blot	96
Abb.3.25: Nck-IPs aus verhungerten und PDGF-stimulierten NIH-Zellen	96
Abb.3.26: WAVE-IPs aus verhungerten und PDGF-stimulierten NIH-Zellen	97
Abb.3.27: Kontrolle der WAVE-IPs	97
Abb.3.28: WAVE2- und N-WASP-IPs aus verhungerten und PDGF-stimulierten NIH3T3	98
Abb.3.29: Manipulation der Nck/WAVE-Interaktion durch Überexpression der potentiellen Interaktoren	99
Abb.3.30 A-D: Nck-k.o. Zellen mit Nck-SH3-Mutanten rekonstituiert	102
Abb.3.30 E-G: Nck-k.o. Zellen mit Nck-SH3-Mutanten rekonstituiert	103
Dia.3.6: Dorsale Ruffles in PDGF-stimulierten Zellen	104
Dia.3.7: Dorsale Ruffles in PDGF-stimulierten Zellen bezogen auf Nck2-Rekonstitution	104
Abb.3.31: <i>targeting</i> -Konstrukt (schematisch)	105
Abb.3.32: Southern Blot nach zweitem <i>targeting</i>	106
Abb.3.33: PCR zur Identifikation heterozygoter Abi1-k.o. Mäuse	107

1 Einleitung

Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen besteht aus drei verschiedenen Komponenten: Den Mikrotubuli, den Intermediärfilamenten und dem Aktin-Filamentsystem. Das Mikrotubuli-System dient als Grundstruktur für Vesikeltransport innerhalb der Zelle, bildet während der Mitose den Spindelapparat aus und ist im Aufbau von Zilien und Geißeln von Bedeutung. Die Intermediärfilamente dienen im wesentlichen der mechanischen Stabilität der Zelle und das Aktin-Mikrofilamentsystem spielt eine entscheidende Rolle bei der Migration von Zellen in der Embryonalentwicklung, in der Wundheilung und bei der Metastasierung von Tumorzellen, die auf Reorganisationen des Aktin-Filamentsystems zurückzuführen ist. Für das Immunsystem ist dieses Mikrofilamentsystem ebenfalls von großer Bedeutung, indem es verschiedenen beteiligten Zellen Beweglichkeit verleiht und die Phagocytose von Pathogenen ermöglicht. Für diese dynamischen Prozesse ist die Fähigkeit des Aktins zur raschen Polymerisation und Depolymerisation entscheidend. Obwohl wichtige Details hinsichtlich dieser Prozesse in den letzten Jahren erforscht wurden und uns heute bekannt sind, sind die Signalwege zur Steuerung dieser Aktinreorganisation noch zu großen Teilen unbekannt. Eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen hier eine Reihe von Adaptorproteinen, die über SH3- oder EVH1-Domänen spezifisch an Prolin-reiche Sequenzen in relevanten Proteinen, wie zum Beispiel den WASP/Scar-Proteinen binden können. Inhalt dieser Arbeit ist es, die Erkenntnisse über Bindungsverhalten bestimmter Proteine aus vorausgegangenen Arbeiten zu vertiefen. Ein besseres Verständnis der zeitlichen und räumlichen Änderungen innerhalb dieses ausgewählten „Interaktoms“ ist essentiell für die Auflösung und eventuell gezielte Manipulation von Signalwegen zur Aktinreorganisation.

1.1 Aktinpolymerisation

Der Grundbaustein des Aktin-Mikrofilamentsystems ist das 42kD große globuläre Protein G-Aktin. Bei diesem Protein handelt es sich um eine ATPase, also ein ATP-bindendes und spaltendes Protein, das durch nicht-kovalente Bindung an andere G-Aktine ein filamentöses Polymer, das F-Aktin bildet. Das gebundene ATP wird

während der Polymerisation zu F-Aktin zu ADP und Phosphat hydrolysiert. Dieser Vorgang ist aber zumindest *in vitro* für die Polymerisation selbst nicht essentiell. Ausgangspunkt für ein F-Aktin-Polymer ist ein Nukleationskeim aus 3 G-Aktin Monomeren. Das entstehende Filament ist polar, das heißt, dass seine zwei Enden unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (siehe Abb.1.1). Die polare Struktur des G-Aktins hat eine gerichtete Anlagerung neuer Monomere zur Folge. An dieses Filament werden solange neue G-Aktinmoleküle angelagert, bis die Konzentration des noch verfügbaren freien G-Aktins einen kritischen Wert erreicht. Ist dieser Wert erreicht, stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein (Korn et al., 1987), bei dem es weder zu einer Netto-Verlängerung noch einer Verkürzung des entsprechenden Filamentendes kommt. Die

Anzahl der abfallenden Monomere entspricht der Zahl der sich anlagernden Monomere. Die Konzentration der Monomere im Gleichgewichtszustand wird aus diesem Grund als kritische Konzentration bezeichnet (Wegner und Isenberg, 1983). Die Affinität von Monomeren ist für das eine Ende (Plusende) des Filaments 12mal höher als für das andere (Minus-) Ende.

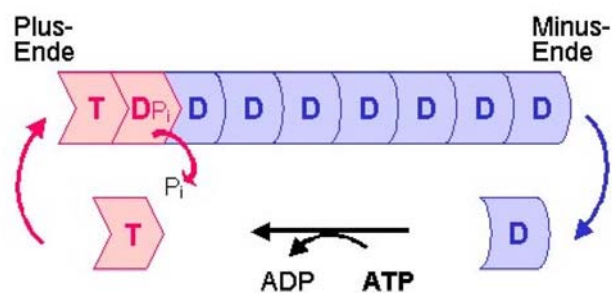


Abb.1.1: Das Tretmühlen-Prinzip resultiert aus der unterschiedlichen Affinität von ATP-Aktin zum Plus-Ende und ADP-Aktin zum Minus-Ende. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Dissoziation am Minus-Ende, von der die Verfügbarkeit von ATP-Aktin und somit die Polymerisation am Plus-Ende abhängt. (nach Pantaloni et al., 2001)

Daraus folgt innerhalb eines gewissen Konzentrationsbereiches eine Elongation an einem Ende und eine Depolymerisation am anderen Ende des Filaments. Der Umsatz des Filaments durch ständige Polymerisation und Depolymerisation erfolgt also nach dem sogenannten „Tretmühlen-Prinzip“.

1.2 Das Mikrofilamentsystem

Das Aktinzytoskelett ist an vielen kraft-erzeugenden Prozessen innerhalb von Zellen beteiligt. Ein Beispiel hierfür ist die Zellmigration, die Bewegung der Zelle, wie sie bei

der Wundheilung und auch in der Embryonalentwicklung eine bedeutende Rolle spielt. Für den bei dieser Fortbewegung auftretenden Vorschub, die Protrusion der Führungslamelle einer Zelle, ist ein Widerlager zur Kraftübertragung notwendig.

Dazu dienen Adhäsionspunkte zwischen Membran und Substrat, die ebenfalls eng mit dem Mikrofilamentsystem verbunden sind. Die sich

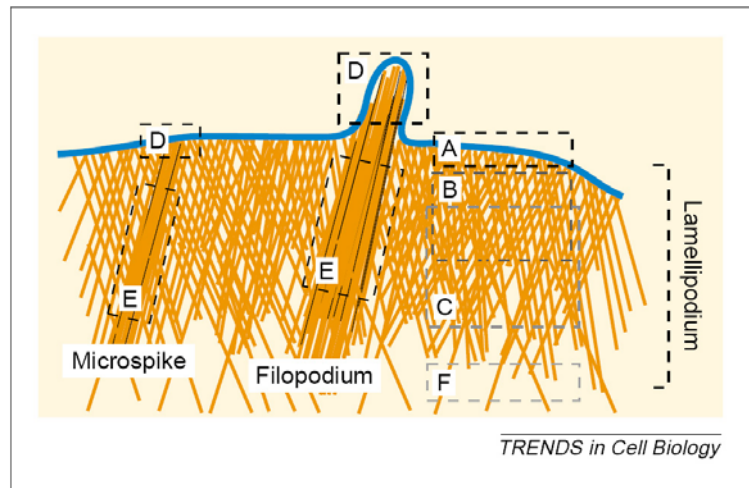


Abb.1.2: Schematische Darstellung einiger Aktin-basierter Strukturen. (A) Lamellipodiale Spitze, (B) Aktinnetzwerk im Lamellipodium, (C) Region des F-Aktinabbaus, (D) Spitzen und (E) Filamentbündel in Microspike und Filopodium, (F) zytoplasmatische F-Aktin-Strukturen. (Small et al., 2002)

vorschiebenden Aktinfilamente sind sehr dicht gepackt und unterliegen einer hohen Dynamik. Die Filamente der protrusiven Organellen des Aktinzytoskeletts sind mit dem Plus-Ende in Vorschubrichtung ausgerichtet (Small, 1988). Diese Organellen bezeichnet man als Lamellipodien, Filopodien und Microspikes. Lamellipodien sind flache, breite Ausstülpungen der Zellperipherie, die vor allem in der Führungslamelle von Fibroblasten und anderen motilen Zellen in Kultur beobachtet werden können (Abercrombie et al., 1970). Die darin enthaltenen diagonal angeordneten Filamente bilden ein dichtes Netz (Small et al., 1989; Rinnerthaler et al., 1991; Mitchison und Cramer, 1996). Die schnell wachsenden barbed ends sind hierbei für einen effektiven Vorschub wie oben beschrieben zur Membran hin ausgerichtet. Bei Filopodien handelt es sich um Bündel aus parallel angeordneten Aktinfilamenten (Lewis und Bridgman, 1992) die durch weitere Proteine, wie z.B. Fimbrin, zusammengefasst werden (Matsudaira, 1994), wobei zylindrische Ausstülpungen der Membran ins Substrat entstehen. Die Signalwege zur Bildung von Lamellipodien und Filopodien weisen grundlegende Unterschiede auf, die an anderer Stelle näher erläutert werden. Ebenfalls in der Führungslamelle einiger Zellen kommen weitere Aktin-basierte Strukturen, sogenannte Microspikes vor. Es handelt sich dabei um in Lamellipodien eingebettete, orthogonale Filamentbündel (Mitchison und Cramer, 1996), welche den Filopodien strukturell ähneln aber nicht über die lamellipodiale Front hinausragen

(siehe Abb.1.2). Sie durchziehen die Führungslamelle und sind in ihr lateral beweglich (Small et al., 1996).

Weitere prominente Aktinstrukturen, stellen in Fibroblasten und epithelialen Zellen die sogenannten Stressfasern dar. Dabei handelt es sich um Filamentbündel, die gemeinsam mit dem Motorprotein der Myosin den kontraktilem Apparat der Zellen bilden. In einigen Zelltypen lagern sich diese Stressfasern zu größeren Elementen zusammen und es entstehen Strukturen, die den Untereinheiten in den Muskeln, den Sarkomeren ähneln und dementsprechend als Pseudosarkomer bezeichnet werden. Streßfasern sind über Fokalkontakte am Substrat außerhalb der Zelle verankert (Izzard und Lochner, 1976). In diesen Komplexen erfüllen weitere Proteine neben der Verankerung Aufgaben in der Signaltransduktion von der Extrazellulären Matrix hin zum Zytoskelett.

Diese verschiedenen strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Aktinzytoskeletts erfordern ein Zusammenspiel einer großen Anzahl weiterer aktinbindender Proteine.

1.3 Regulation der Filamente durch Aktin-bindende Proteine

Die Organisation der Aktinfilamente, wie Länge, Ausrichtung oder Polymerisationsgeschwindigkeit ist streng reguliert und wird durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst.

Die Länge der Aktinfilamente kann durch eine Reihe von Aktin bindenden Proteinen reguliert werden. Zum Einen gibt es Monomer bindende Proteine, die die Verfügbarkeit des G-Aktin regulieren. Als Beispiele hierfür sind β -Thymosine und Profilin zu nennen. Profilin bindet an G-Aktin und fördert den Austausch von ADP zu ATP im Aktinmonomer. Profilin/Aktin-Komplexe können nicht spontan polymerisieren, sondern dienen als bevorzugte Vorstufe für den Einbau in Filamente durch sogenannte Aktinpolymerasen. Thymosin β 4 zum Beispiel verhindert eine Bindung der Monomere an F-Aktin, setzt so deren Verfügbarkeit herab und reduziert somit die Bildung längerer Filamente. Da diese beiden Proteine nicht gleichzeitig an G-Aktin binden können, kommt es zu einer Kompetition der Moleküle um vorhandene Monomere. Über das Verhältnis von Profilin zu Thymosin β 4 kann so in der Zelle die Polymerisationsaktivität zu einem gewissen Maß reguliert werden. Es existieren

darüber hinaus auch noch einige β -Thymosin-verwandte Proteine, die wie Profilin die Polymerisation von Aktin eher positiv beeinflussen. Manche Arbeiten gehen davon aus, dass alle Proteine dieser Klasse zuvor eine Profilin-ähnliche Funktion hatten und sich die antagonistische Wirkung von Thymosin $\beta 4$ gegenüber Profilin erst später im Verlauf der Evolution daraus entwickelt hat (Boquet et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation bieten sogenannte „capping“-Proteine, die an den jeweiligen Enden des F-Aktins binden. Hierbei kann zum Beispiel das Plus-Ende des Aktins durch ein solches Protein blockiert werden, so dass die Polymerisation in diesem Filament zum Erliegen kommt. Ein Beispiel für ein solches Protein ist CapZ. Durch bestimmte Signale (z.B. PIP2) kann das Plus-Ende wieder frei gegeben werden.

Als eine weitere Gruppe von Plus-ende-spezifischen „capping“-Proteinen sind in den letzten Jahren die Formine zunehmend ins Blickfeld der Mikrofilament-Forschung geraten. Anders als CapZ haben sie dort aber keine hemmende Wirkung, sondern fungieren als Aktinpolymerasen. Eine ähnliche Funktion erfüllt der Arp2/3-Komplex, bedient sich jedoch eines völlig anderen Mechanismus. Die genaue Funktion dieses Komplexes wird in Kapitel 1.4 näher erläutert.

Eine ebenfalls Netto-Polymerisationsfördernde Funktion, wenn auch mit grundsätzlich anderen Mitteln, erzielen Proteine, die vorhandenes F-Aktin schneiden, sog. „severing“-Proteine. Die erhöhte Anzahl an freien Plus-Enden bei insgesamt verringerter Filamentlänge führt zu einer verstärkten Polymerisation. Ein bekanntes Protein dieser Art ist Gelsolin.

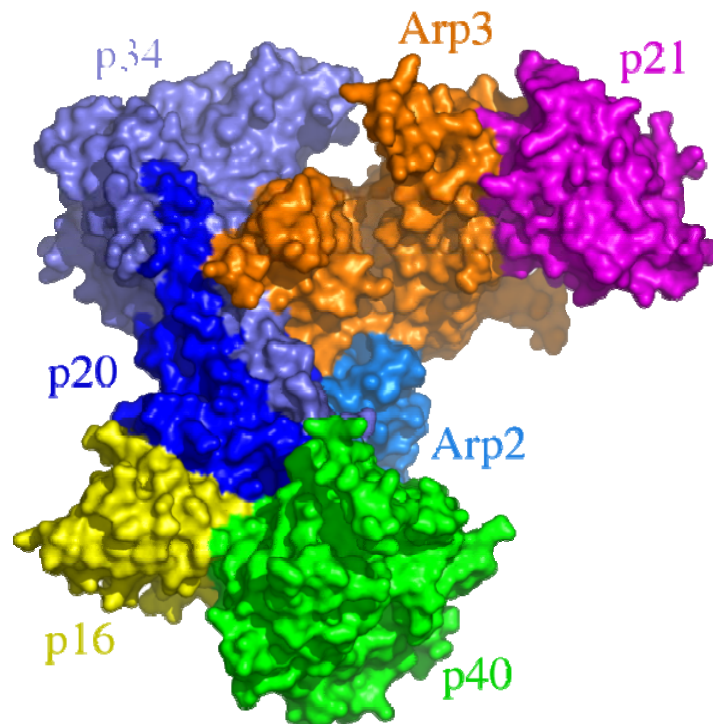
Proteine, die an F-Aktin binden und dieses bündeln, stabilisieren oder es destabilisieren, dienen ebenfalls der Regulation. Als Beispiel können hierzu das stabilisierende Tropomyosin und das destabilisierende Cofilin genannt werden. Cofilin ist auch als Aktin-depolymerisierender Faktor bekannt und bindet vorzugsweise an F-Aktin, welches gebundenes ATP bereits zu ADP umgesetzt hat. Da in neu polymerisiertem F-Aktin die Hydrolyse erst nach einiger Zeit eintritt, ist vor allem älteres F-Aktin von diesem depolymerisierenden Faktor betroffen.

Aus den aufgeführten Faktoren in diesem Kapitel ist vor allem der Arp2/3-Komplex für diese Arbeit von Bedeutung. Dieser Komplex stellt einen prominenten Nukleationsfaktor - also eine Aktinpolymerase - dar, der die Bildung neuer Aktinfilamente katalysiert. Die verschiedenen Signalwege, die zur Aktivierung dieses Komplexes führen, sind ein Hauptthema der vorliegenden Arbeit.

1.4 Der Arp2/3-Komplex

Die Aktinpolymerisation stellt die Grundlage für die Protrusion zellulärer Strukturen, wie Lamellipodien, Filopodien und Ruffles, sowie für die Bewegung der Zelle insgesamt dar. Dieser Prozess ist abhängig vom Wachstum der Filamente an deren Plus-Enden, von der Stabilisierung der Filamente und deren Netzwerke und vom regulierten Abbau der Filamente an den Minus-Enden. Ein kritischer Faktor ist die Nukleation neuer Filamente durch die Bildung von Dimeren und Trimeren. Die

Bildung solcher Nukleationskeime genannter Ausgangsstrukturen ist energetisch ungünstig so dass für eine effiziente Polymerisation Katalysatoren benötigt werden. Der Arp2/3-Komplex, dargestellt in Abb.1.3, ist ein solcher Katalysator. Es handelt sich um einen Komplex aus 7 Untereinheiten, in denen ein Heterodimer aus Aktin-verwandten Proteinen, den



Actin-Related Proteins Arp2 und Arp3, den katalytischen Kern bildet (Mullins et al., 1998). Im Komplex ist dieses Dimer stabiler als ein G-Aktin-

Abb.1.3: 3-dimensionales Strukturmodell des Arp2/3-Komplexes mit seinen 7 Untereinheiten. Die namensgebenden Hauptkomponenten Arp2 und Arp3 sind zentral in blau bzw. orange dargestellt (Robinson et al., 2001).

Dimer und kann durch Bindung nur eines weiteren G-Aktin-Moleküls als Nukleationskeim dienen (Higgs und Pollard, 1999). Der Arp2/3-Komplex verbleibt bei fortlaufender Elongation des neu gebildeten Filaments an dessen Minus-Ende. Er dient dort als „capping“-Struktur und blockiert die Depolymerisation bei ungehinderter Polymerisation am Plus-Ende. Eine häufig diskutierte Funktion des Komplexes ist sein Beitrag zur Bildung eines Aktin-Netzwerks. Erst ein sich vorschiebbendes Netzwerk aus Aktin-Filamenten, so die Annahme, macht Protrusion mit dieser

Effizienz möglich. Eine Möglichkeit zur Bildung eines solchen Netzwerks stellt ein seitliches Binden des Arp2/3-Komplexes an bestehende Filamente dar (Bailly et al., 2001). Ob jedoch eine solche Verzweigung, wie sie *in vitro* beobachtet werden kann (Amann und Pollard, 2001) *in vivo* eine Rolle spielt, ist unklar. Falls dem so ist, so findet diese Verzweigung eher während der Katalyse statt und ist von sehr kurzer Lebensdauer, da solche Verzweigungen im lamellipodialen Aktin nicht nachgewiesen werden können (Small et al., 2008).

1.5 Die Interaktion von WASP/Scar – Proteinen mit dem Arp2/3-Komplex

Die Aktivität des isolierten Arp2/3-Komplexes zur Stimulierung der Aktin-Polymerisation ist *in vitro* relativ gering (Higgs et al., 1999). Eine große Anzahl von Proteinen konnte in den letzten 10 Jahren identifiziert werden, welche den Arp2/3-Komplex aktivieren können. Als erstes Protein mit dieser Fähigkeit wurde ActA, ein Oberflächenprotein des Bakteriums *Listeria monocytogenes* identifiziert. Mit Hilfe dieses Proteins nutzt das Bakterium die Aktinpolymerisationsmaschinerie der Wirtszelle, um eigene Motilität innerhalb der Zelle zu erlangen (Welch et al., 1998). Die als erstes beschriebenen eukaryotischen Arp2/3-aktivierende Faktoren waren die Proteine der WASP/Scar-Familie. Die WASP/Scar-Proteine besitzen alle eine C-terminale WA-Domäne, die diese Eigenschaft besitzt (Machesky et al., 1999; Rohatgi et al., 1999; Yasar et al., 1999). Diese Familie besteht aus 5 Mitgliedern: WASP, N-WASP, WAVE1, WAVE2 und WAVE3 (wobei WAVE1-3 gelegentlich auch als Scar1-3 bezeichnet werden). Alle Mitglieder der Familie weisen am C-Terminus die oben genannte WA- oder auch VCA-Domäne auf. Sie besteht in jedem Protein aus einem WH2-Motiv (WASP-Homologie), auch Verprolin-Homologie-Motiv genannt (V), einer Cofilin-ähnlichen Verbindungsregion (C) und einem sauren C-Terminus (A für „acidic“). Über die WH2-Domäne wird G-Aktin rekrutiert (Miki und Takenawa, 1998), die CA-Domäne bindet an den Arp2/3-Komplex (Machesky et al., 1999). Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind die Prolin-reichen Regionen die typischerweise N-terminal vor dieser VCA-Domäne liegen und die Bindungsmotive für SH3-Domänen darstellen. Eine Übersicht über die Domänen der WASP/Scar-Proteine ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

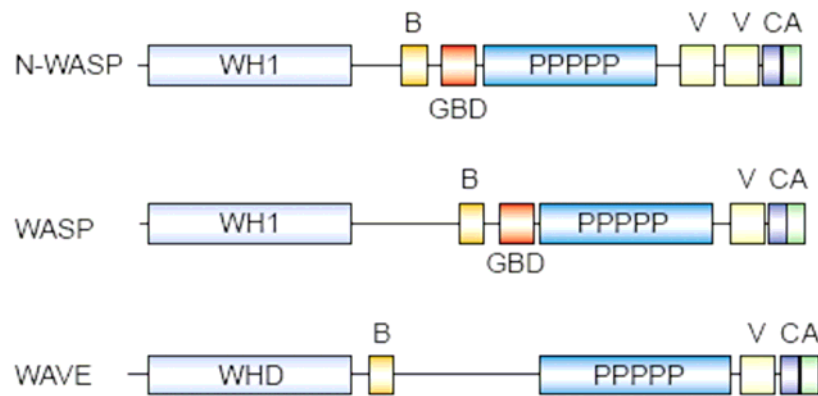


Abb.1.4: Domänenstrukturen der WASP/Scar-Proteine. N-WASP verfügt anders als die übrigen Mitglieder über 2 Verprolin-Homologie Regionen (V) am C-terminus, die WAVEs unterscheiden sich von WASP und N-WASP im wesentlichen durch die fehlende zentrale GTPasen-Bindungsdomäne (GDB) (Stradal et al., 2004).

1.5.1 WASP und N-WASP

Mutationen im WASP-Gen verursachen Anomalien im Zytoskelett von Lymphozyten und Defekte in der Blutplättchenentwicklung (Higgs und Pollard, 1999). Die Krankheit, die durch diese Defekte hervorgerufen wird, heißt nach ihren Entdeckern Wiskott-Aldrich Syndrom und gab dem Wiskott-Aldrich Syndrom Protein, kurz WASP seinen Namen. Die Beschränkung des Phänotyps dieser Mutation auf das hämatopoetische System ist mit der ausschließlich dort auftretenden Expression von WASP zu erklären.

N-WASP (von Neural Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) hingegen ist ubiquitär exprimiert, weist aber eine besonders hohe Expression im Nervensystem auf. Die Aminosäuresequenzen von WASP und N-WASP sind zu etwa 50% identisch, wobei die funktionellen Domänen (Abb.1.3) der Proteine in höherem Maße konserviert sind. Die Domänenstruktur stimmt weitestgehend überein. N-WASP enthält lediglich eine zweite Verprolin-Homologie-Region vor der VCA-Domäne. Ausser der VCA-Domäne finden sich in WASP und N-WASP noch 4 weitere funktionelle Regionen: eine N-terminale WH1-Domäne, eine basische Region gefolgt von einer GBD/CRIB-Domäne und die bereits angesprochene Polyprolin-Region.

Die WH1-Domäne bindet die Familie der WASP-interacting Proteine, kurz WIPF, welche die Aktivität von N-WASP weiter verstärken (Ramesh et al., 1997). Die WIP-Familie umfasst 3 Mitglieder mit unterschiedlichen aber überlappenden Expressionsmustern (WIPF1 = WIP, WIPF2 = WIRE, WIPF3 = CR16). Die basische

Region stellt eine Bindungsstelle für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) dar (Rohatgi et al., 2000). Die GB/CRIB-Domäne (GTPase-binding/Cdc42 and Rac interactive binding) bindet mit hoher Affinität an die aktive Form der GTPase Cdc42 der Rho Familie, welche für ihre Signalvermittlung an das Aktinzytoskelett und im Falle von Cdc42, für die Induktion von Filopodien bekannt ist. Da in N-WASP knock-out Zellen allerdings eine unveränderte Filopodienbildung beobachtet werden konnte (Lommel et al., 2001), ist eine direkte Beteiligung von N-WASP in der Filopodienbildung unwahrscheinlich.

Weiterhin kann eine Region unmittelbar neben der GB-Domäne durch Binden an die C-terminale Region des gleichen Moleküls eine Autoinhibition von N-WASP vermitteln, die die Fähigkeit der VCA-Domäne, den Arp2/3-Komplex zu aktivieren, blockiert (Higgs und Pollard, 2000). Eine Aufhebung der Autoinhibition wird synergistisch durch mehrere Faktoren herbeigeführt, wie zum Beispiel kooperative Aktivierung über Cdc42 und PIP_2 . Aktiviertes GTP-gebundenes Cdc42 bindet an die GB/CRIB-Domäne und verdrängt durch diese Konkurrenz die C-Region (Kim et al., 2000). PIP_2 setzt durch Bindung an die basische Region deren Affinität zum (sauren) C-Terminus weiter herab (Rohatgi et al., 2000), wodurch die Autoinhibition aufgehoben wird. Diese beiden Ereignisse zusammen lösen den C-Terminus vollständig von den mittleren Regionen des Proteins und legen damit die VCA-Domäne frei, so dass der Arp2/3-Komplex gebunden und aktiviert werden kann. Auch die Bindung von SH3-Domänen an die zentrale Prolin-reiche Region in WASP und N-WASP kann aktivierende Wirkung haben und auch für diese Interaktionen wurde ein Synergismus mit PIP_2 -Bindung beobachtet (Rohatgi et al., 2001)

Die lange Prolin-reiche Region zwischen GB/CRIB- und VCA-Domäne in WASP und N-WASP ist für die vorliegende Arbeit besonders interessant, da sie als Bindungsstelle für viele der hier untersuchten SH3-Domänen Proteine, wie Nck1/2, IRSp53 oder Abi1 dient. Eine Übersicht über die Domänenstruktur und einige Bindungspartner ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

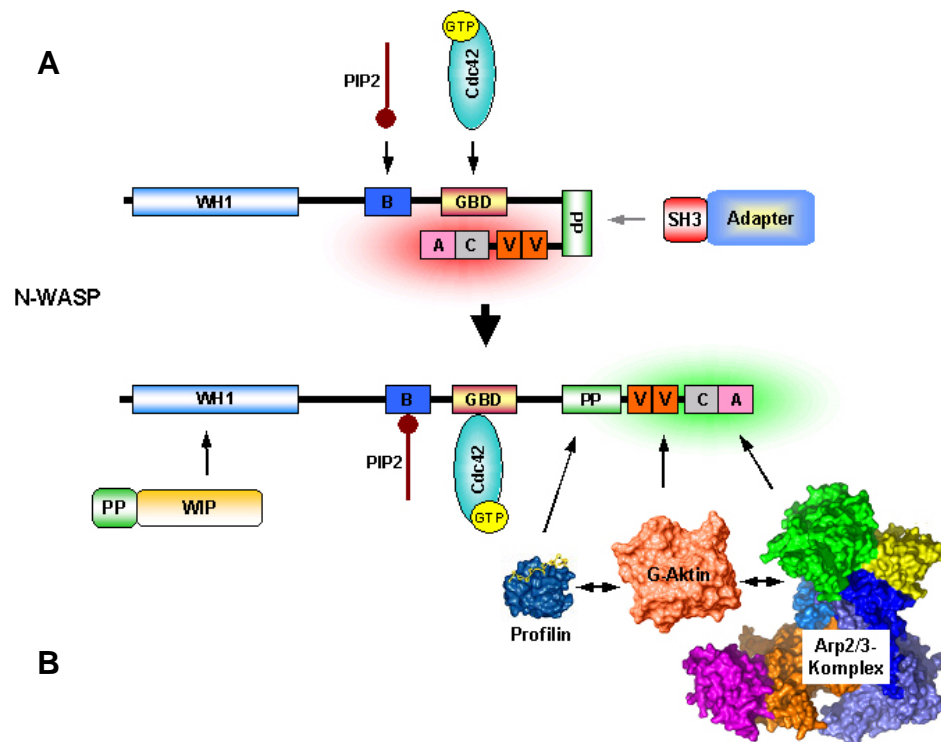


Abb.1.5: N-WASP im autoinhibierten Zustand (A) und im aktiven Zustand (B). Die Aktivierung von WASP und N-WASP erfolgt über Binden von PIP2 an die basische Region und aktivem Cdc42 an die GBD. SH3-Adaptoren können durch Binden an die Prolin-reiche Region ebenfalls zur Aktivierung beitragen. Im aktiven Zustand kann der Arp2/3-Komplex an die VCA-Domäne rekrutiert und aktiviert werden. Über die Prolin-reiche Region kann außerdem Profilin-gebundenes G-Aktin in unmittelbare Nähe des Arp2/3-Komplexes an die VCA-Domäne rekrutiert werden.

1.5.2 WAVE1, WAVE2 und WAVE3

Ebenso wie WASP und N-WASP haben auch die WAVE-Proteine eine WH2- bzw. VCA-Domäne. Als erstes Protein dieser Art wurde Scar1 in der Amöbe *Dictyostelium* identifiziert (Bear et al., 1998) gefolgt von dessen Äquivalent in Säugerzellen WAVE1 (Miki et al., 1998; Machesky und Insall, 1998) und den weiteren Isoformen WAVE2 und WAVE3. Alle 3 WAVEs werden ubiquitär aber mit gewebespezifischen Schwerpunkten exprimiert. WAVE1 und WAVE3 sind vornehmlich im Gehirn exprimiert, während WAVE2 die ubiquitäre Hauptform ist und eine Anreicherung in peripheren Leukozyten aufweist (Suetsugu et al., 1999). Die Unterschiede zwischen den einzelnen WAVE-Isoformen sind noch nicht ganz geklärt. WAVE1 lokalisiert in B16F1-Zellen durchgehend an der Führungslamelle, nicht aber in Filopodien (Hahne et al., 2001). WAVE2 und WAVE3 wurden bei der Entstehung von Microspikes, an

der Führungslamelle und auch in filopodialen Spitzen beobachtet (Nozumi et al., 2003). Der C-terminus mit seiner VCA-Domäne und der Prolin-reichen Region ist homolog zu WASP und N-WASP. Dies ermöglicht eine Aktivierung des Arp2/3-Komplexes und eine Bindung von SH3-Domänen relevanter Effektor-Proteine. Der N-Terminus enthält eine als WAVE-Homologie-Domäne (WHD) bezeichnete Region, gefolgt von einem basischen Abschnitt, der *in vitro* als bedeutend für die Arp2/3-vermittelte Aktinpolymerisation beschrieben wurde (Suetsugu et al., 2001).

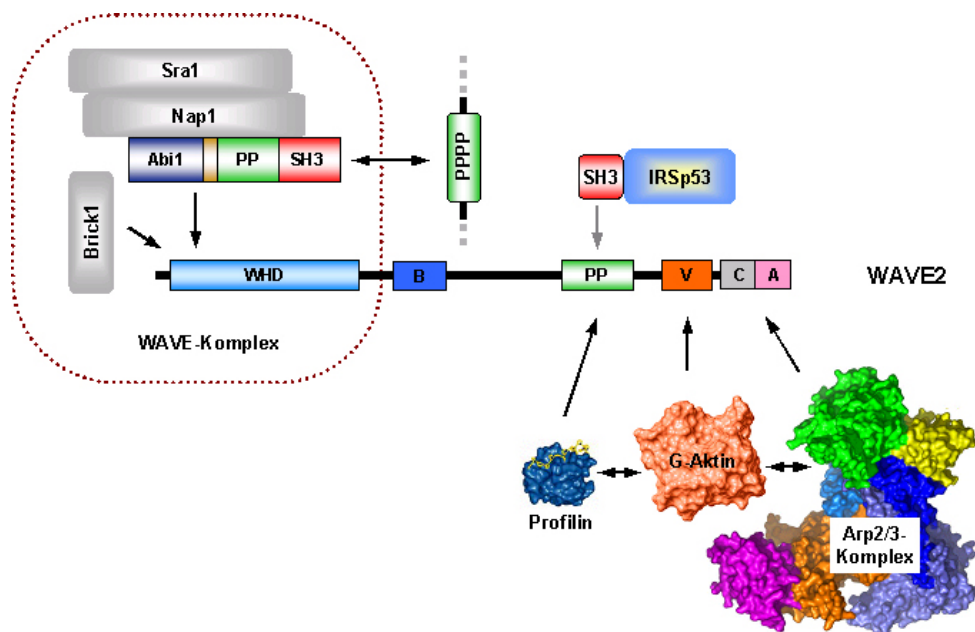


Abb.1.6: Der WAVE-Komplex. Zusammen mit Sra1, Nap1, Abi1 sowie Brick1 bildet WAVE einen Komplex, der für die Regulation der Arp2/3-aktivierenden Funktion verantwortlich ist. Sowohl Abi1 als auch WAVE selbst verfügen über Prolin-reiche Regionen. IRSp53 z.B. kann mit seiner SH3-Domäne an WAVE binden. Über die SH3-Domäne von Abi1 kann der Komplex seinerseits ebenfalls mit Prolin-reichen Regionen weiterer Proteine interagieren. Die Funktion der VCA-Domäne entspricht im aktiven Zustand der von N-WASP bzw. WASP.

Anders als WASP und N-WASP wird WAVE nicht durch Autoinhibition reguliert. Vielmehr ist WAVE ein Teil eines konstitutiven Komplexes, der ausser WAVE noch Sra1, Nap1, Abi1 (siehe Kapitel 1.10) und Brick1 (auch HSPC300) enthält. WAVE2 bildet dabei den ubiquitär exprimierten Hauptbestandteil. WAVE1 und WAVE3 können WAVE2 in den entsprechenden Zellen ersetzen. Ebenso stehen PIR121 als Sra1-Paralogon und HEM1 als Nap1-Paralogon gewebsspezifisch zur Verfügung. Abi1 kann durch Abi2 oder Abi3 ersetzt werden. In Abbildung 1.6 ist dieser Komplex sowie die Domänenstruktur von WAVE schematisch dargestellt.

Der Aktivierungsmechanismus für den WAVE-Komplex ist noch unbekannt. Eine vorgeschlagene transinhibitorische Wirkung des Komplexes und seine Aktivierung nach Auseinanderfallen der Komponenten (Eden et al., 2002) wurde widerlegt.

Es wird inzwischen davon ausgegangen, dass Teile des Komplexes einer Rac1-abhängige Konformationsänderung unterliegen und auf diese Weise die Regulation der Arp2/3-aktivierenden Funktion von WAVE übernehmen (Steffen et al., 2004; Innocenti et al., 2004). Die 2 Modelle der Funktion des WAVE-Komplexes sind in Abb.1.7 dargestellt. Diese Arbeit soll Erkenntnisse liefern, die zum Verständnis der Funktionsweise des WAVE-Komplexes beitragen.

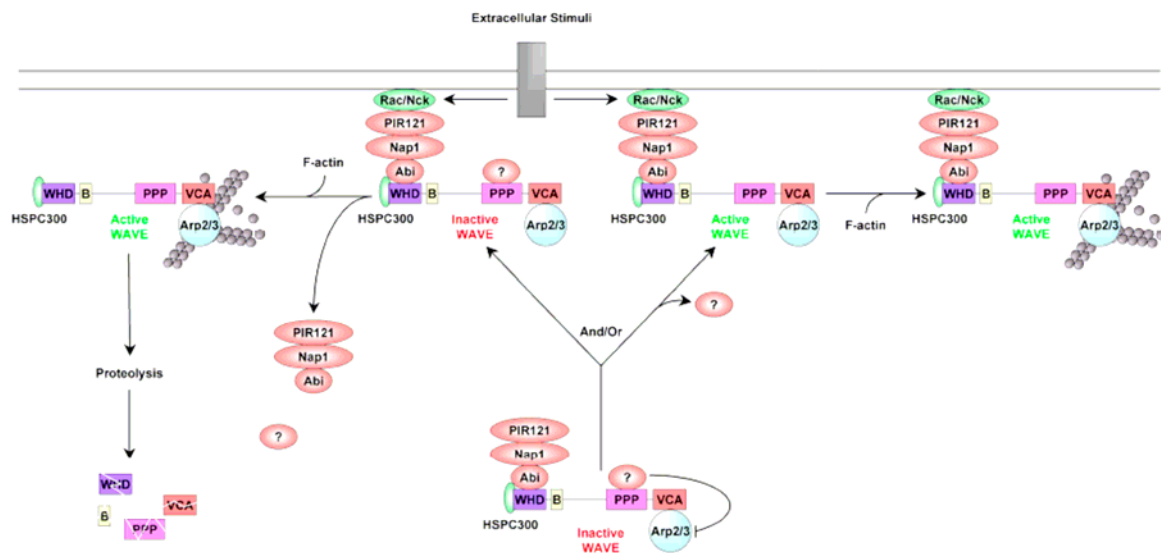


Abb.1.7: 2 Modelle der Funktionsweise des WAVE-Komplexes. Auf der linken Seite ist die postulierte transinhibitorische Wirkung des Komplexes auf WAVE dargestellt. Auf einen extrazellulären Stimulus hin bewirkt ein Binden von aktiviertem Rac1 den Zerfall des Komplexes und eine Freisetzung des aktiven WAVEs und seine anschließende Proteolyse. Auf der rechten Seite ist die Aktivierung von WAVE durch den intakten Komplex dargestellt, wie sie 2004 von Steffen et al. nachgewiesen wurde (Bompard und Caron, 2004)

1.6 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf WASP/Scar-Proteine

Auf Zellen im Gewebeverband wirkt eine große Zahl verschiedener Signale die in der einen oder anderen Weise auf das Aktinzytoskelett übertragen werden. Eine wichtige Gruppe von Signalmolekülen, die extrazelluläre Signale an das Mikrofilamentsystem vermitteln, stellen bestimmte Wachstumsfaktoren, wie der hepatocyte growth factor (HGF), der epithelial growth factor (EGF) oder der platelet-derived growth factor (PDGF) dar. Letzterer Wachstumsfaktor ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung.

Der PDGF-Rezeptor ist, wie praktisch alle Wachstumsfaktorrezeptoren, eine transmembrane Rezeptortyrosinkinase (RTK). In humanen Zellen gibt es 2 Isoformen des PDGF-Rezeptors, den α - und den β -Rezeptor. Beide Isoformen sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut und bestehen aus einem extrazellulären Teil, der in der Lage ist, PDGF zu binden, und einem intrazellulären Teil, der die Tyrosinkinase-Domäne enthält (Matsui et al., 1989; Claesson-Welsh et al., 1989). PDGF ist ein Dimer aus 2 Untereinheiten ist, kann 2 Rezeptoren gleichzeitig binden und bringt sie so in unmittelbare Nähe zueinander. Eine Besonderheit ist hierbei, dass es 4 verschiedene PDGF-Untereinheiten gibt, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D. Es besteht also die Möglichkeit, dass

Homodimere dieser einzelnen Untereinheiten vorliegen (Haniu et al., 1993; 1994); es kann aber auch zur Bildung von PDGF-AB Heterodimeren kommen (Ekman et al., 1999). Theoretisch können nun verschiedene Bindungsvarianten

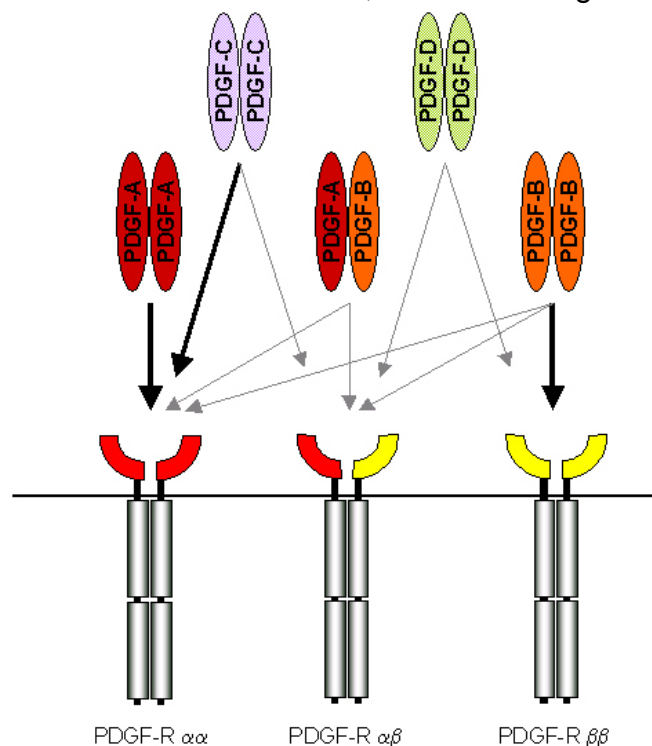


Abb.1.8: PDGFs und PDGF-Rezeptoren. Die Abbildung zeigt schematisch die *in vitro* beobachteten Bindungsmöglichkeiten der unterschiedlichen PDGF-Dimere und die daraus resultierenden Rezeptorpaare. *In vivo* nachgewiesene Interaktionen sind mit dickeren, schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Der PDGF-Rezeptor α ist hier mit roter, der PDGF-R β mit gelber PDGF-Bindungsregion dargestellt.

vorkommen. PDGF-A bindet dabei ausschließlich an den α -Rezeptor, während PDGF-B sowohl an den α - als auch den β -Rezeptor bindet. Das heißt, dass PDGF-AA ein $\alpha\alpha$ -Rezeptor-Homodimer bildet, PDGF-AB sowohl ein $\alpha\alpha$ -Homodimer, als auch ein $\alpha\beta$ -Heterodimer und PDGF-BB alle drei möglichen Varianten eines Rezeptordimers bilden kann (Review Heldin und Westermark, 1999). PDGF-C und PDGF-D bilden zunächst nur inaktive Homodimere, die allerdings von spezifischen Proteasen durch Abspaltung einer CUB-Domäne aktiviert werden können. Das PDGF-C Dimer bindet *in vitro* vorzugsweise an den α -Rezeptor (Li et al., 2000), wodurch ein $\alpha\alpha$ -Rezeptor-Homodimer resultieren kann. PDGF-D bindet vorzugsweise an den β -Rezeptor (Bergsten et al., 2001), was ein $\beta\beta$ -Homodimer zur Folge hat. Sowohl bei PDGF-C, als auch bei PDGF-D wurden *in vitro* aber ebenfalls $\alpha\beta$ -Rezeptor-Dimere beobachtet. *In vivo* ließen sich allerdings bislang lediglich ein $\alpha\alpha$ -PDGF-Rezeptordimer nach Bindung von PDGF-A- oder PDGF-C-Molekülen sowie ein $\beta\beta$ -PDGF-Rezeptordimer nach Bindung von PDGF-B nachweisen (Review Andrae et al., 2008). Die möglichen Kombinationen sind in Abb.1.8 gezeigt.

Werden nun 2 Rezeptormoleküle durch Bindung ihres Liganden dimerisiert, kommt es durch die Tyrosinkinasedomänen zur Autophosphorylierung in den intrazellulären Rezeptorregionen, welche zum Einen die Kinaseaktivität der RTK vollständig aktiviert und zum Anderen eine Bindungsoberfläche für SH2-Domänen bietet. Eine ganze Reihe von Enzymen und Adapterproteinen enthält SH2-Domänen, die an Tyrosin-Phosphorylierte PDGF-Rezeptoren binden.

Zu diesen Proteinen zählt die PI3-Kinase. Sie setzt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI(4,5)P₃) um welches beispielsweise an der Aktivierung von WAVE-vermittelter Aktinreorganisation beteiligt ist, Zellwachstum oder Chemotaxis steuert.

Grb2 und Nck zählen zu den PDGF-bindenden Adapterproteinen (Nishimura et al., 1993). Sie verfügen über je eine SH2 Domäne und im Fall von Grb2 über zwei, im Fall von Nck über drei SH3-Domänen.

Grb2 kann beispielsweise über eine seiner SH3-Domänen Sos rekrutieren, welches somit über PDGF aktiviert werden kann. Sos wiederum ist in der Lage, die kleine GTPase Ras zu aktivieren, und hat somit Einfluss auf eine Anzahl von Signalwegen, wie auf die MAP- Kinase (mitogen activated protein) Kaskade. In diesem Zusammenhang wurde eine Ser/Thr-Phosphorylierung von WAVE nach Stimulation

von Fibroblasten mit PDGF beobachtet (Miki et al., 1999). Die Funktion des MAP-Kinase Signalwegs hierfür wurde diskutiert, ist allerdings fraglich.

Über Nck kann eine Vielzahl von Proteinen in den Wirkungsbereich des PDGF-Rezeptors rekrutiert werden. Im Detail werden die Interaktionspartner von Nck an anderer Stelle erläutert. Nck ist notwendig für PDGF-induzierte Zellmigration und Aktindynamik, wie z.B. die Bildung von dorsalen *Ruffles* (Rivera et al., 2006). Viele der Signalwege, die von den angesprochenen Proteinen ausgehen, sind nicht vollständig geklärt. Morphologischen Beobachtungen lassen aber den Schluss zu, dass die Natur des PDGF-Dimers und die daraus resultierenden Kombinationen von PDGF-Rezeptor-Dimeren einen wesentlichen Einfluss auf die tatsächlich angesprochenen Signalwege haben. So ist zum Beispiel die Bildung von kreisförmigen Ausstülpungen auf dem Zellkörper, sogenannten dorsalen Ruffles, ausschließlich nach Stimulation der β -Rezeptoren zu beobachten. Andere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass dem α -Rezeptor hauptsächlich PI3-Kinase- und Src-abhängige Signalwege nachfolgen, während der β -Rezeptor neben der PI3-Kinase auch Ras-GAPs und Nck-vermittelte Signalwege betrifft. Abbildung 1.9 zeigt einen Überblick über die angesteuerten Signalwege der PDGF-Rezeptoren.

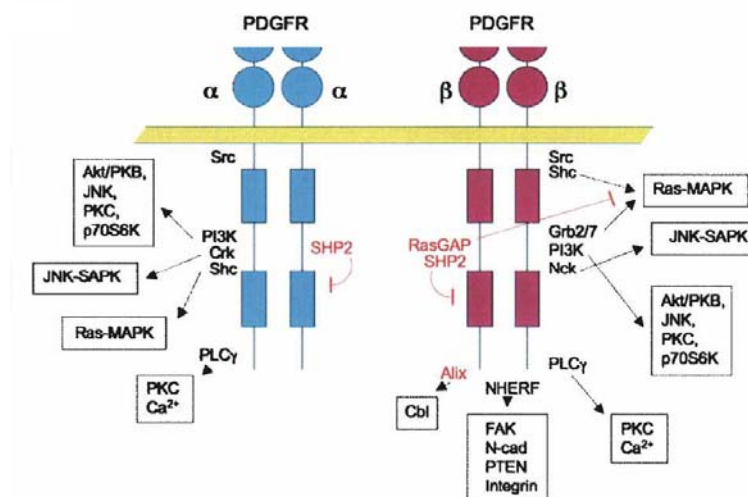


Abb.1.9: Übersicht über die Signalwege unter Einfluss der PDGF-Rezeptoren. Sowohl α - als auch β -Rezeptor aktivieren gut charakterisierte Signalwege wie den PI3-Kinase- und den Ras-MAP-Kinase-Weg. Der β -Rezeptor interagiert ausserdem mit sog. Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factors (NHERFs), welche auch eine Rolle für das Aktinzytoskelett spielen. Entscheidend für diese Arbeit ist aber die Interaktion zwischen aktiviertem Rezeptor und dem SH3-Adapter Nck, der ebenfalls eine Verbindung mit dem Zytoskelett darstellt. (Review Andrae et al., 2008)

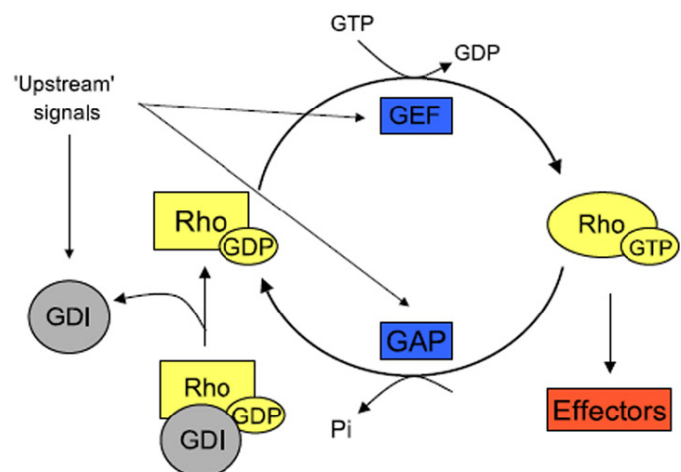
1.7 Kleine GTPasen und deren Funktion im Mikrofilamentsystem

Eine weitere für das Mikrofilamentsystem wichtige Gruppe von Signalproteinen sind kleine GTPasen der Rho-Familie. Sie sind innerhalb der Signalwege hierarchisch unter eben beschriebenen Membranrezeptoren angeordnet und werden von einem breiten Spektrum von Rezeptortypen aktiviert. Die Funktion einer solchen GTPase entspricht der eines molekularen Schalters, der zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen Form und einer aktiven, GTP-gebundenen Form hin und her wechseln kann (siehe Abb.1.10). Die Regulation der Aktivität der kleinen GTPasen unterliegt 3 weiteren Arten von Proteinen.

- GEFs (Guanin Nucleotid Austauschfaktoren) aktivieren GTPasen, indem sie den Nucleotidaustausch von „verbrauchtem“ GDP gegen GTP katalysieren.
- GAPs (GTPase aktivierende Proteine) stimulieren die enzymatische Aktivität von GTPasen und damit die Spaltung von GTP und den Übergang in die inaktive Form.
- GDIs (Guanin Nucleotid Dissoziations Inhibitor) verhindern die Dissoziation von GTPase und GDP, so dass eine erneute Aktivierung durch Austausch des Nucleotids nicht stattfinden kann.

Für das Aktinzytoskelett sind die Rho-GTPasen, RhoA, Rac1 und Cdc42 am besten erforscht. Die Rho-Familie umfasst noch eine ganze Reihe weiterer GTPasen, die in verschiedene Unterfamilien unterteilt sind.

Abb.1.10: Der Rho-GTPasen-Zyklus. Dargestellt ist der Rho-GTPasen-Zyklus, in dem die GTPase abhängig von äußeren Einflüssen auf GEFs, GAPs und GDIs zwischen inaktivem GDP-gebundenen und aktivem, d.h. GTP-gebundenen Zustand wechseln kann (Raftopoulou und Hall, 2004).



Rho ist an der Regulation des Aufbaus von Aktin/Myosin-Filamenten, den Stressfasern, und der Anheftung von Zellen an die extrazelluläre Matrix über Fokalkontakte beteiligt (Ridley und Hall, 1992; Hall, 1998). Rac und Cdc42 stimulieren die Bildung peripherer Protrusionen wie Lamellipodien, „membrane ruffles“ und Filopodien (Ridley et al., 1992). Rac ist dabei insbesondere für die gerichtete Polymerisation zu Lamellipodien und die daraus resultierende protrusive Kraft verantwortlich. Rho mit seiner kontraktilen Wirkung und die Rac-vermittelte Protrusion haben antagonistische Effekte zueinander. Es wird zudem davon ausgegangen, dass aktiviertes Rac die Aktivität von Rho inhibieren kann (Sander et al., 1999). Cdc42 wird vor allem eine Rolle bei der Aktinorganisation in der Filopodienbildung zugeschrieben (Nobes und Hall, 1995). Außerdem wird Cdc42 noch mit einigen anderen Aktin-abhängigen Prozessen, wie z.B. der Ausbildung der Zellpolarität, in Verbindung gebracht. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition von Cdc42 in Makrophagen die Fähigkeit zur Chemotaxis in Richtung eines CSF-1 Gradienten blockiert, während die Rac-abhängige Motilität davon unbeeinflusst bleibt (Ridley, 2001). Zudem zeigen mehrere Studien eine direkte Aktivierung von Rac durch Cdc42 (Nobes und Hall, 1995; Lamarche et al., 1996).

1.8 SH3-Domänen

An den der Wachstumsfaktoraktivierung nachfolgenden Signaltransduktionen sind viele unterschiedliche Adapterproteine beteiligt. Diese Adapterproteine enthalten meistens zur Bindung an phosphorylierte Tyrosine im aktivierten Rezeptor SH2-Domänen (Src-homology domain 2). Für die Rekrutierung von weiteren Proteinen an den Rezeptor enthalten diese Adapterproteine häufig SH3-Domänen (Src-homology domain 3). Beide Domänen-Typen wurden in Tyrosinkinasen der Src-Familie erstmals charakterisiert. Dabei wurde die Kinase-Domäne als SH1 (Src-homology1) bezeichnet und die folgenden Homologieabschnitte als SH2 und SH3. Erst später wurden weitere Nicht-Kinase-Adapterproteine mit diesen Domänen entdeckt. Der Name für das hier untersuchte Adapterprotein Nck (Non catalytic kinase domains) wurde von dieser Tatsache abgeleitet.

Die Struktur von SH3-Domänen ist stark konserviert. Sie bildet eine Art Sandwich aus zwei 3-strängigen β -Faltblatt-Strukturen (Musacchio et al., 1992). Eine Seite dieser Struktur dient mit seinen hydrophoben Seitenketten als Bindungsfläche für den jeweiligen Liganden. In Strukturanalysen sowie Mutagenesestudien wurde eine linksgedrehte Polyprolin-Tyrosin-Helix (PPII) mit der minimalen Consensus-Sequenz XP-x-XP als kleinstmöglicher Ligand identifiziert (Feng et al., 1994). Die beiden XP-Motive belegen 2 hydrophobe Taschen in der Bindungsfurche der SH3-Domäne. Eine dritte Bindungstasche weist häufig einige negativ geladene Seitenketten auf, die als Bindungsstelle für eine positiv geladene Seitenkette des Liganden dienen (siehe Abb.1.11, Position 21). Auf diese Weise kann die Ausrichtung des Liganden abhängig

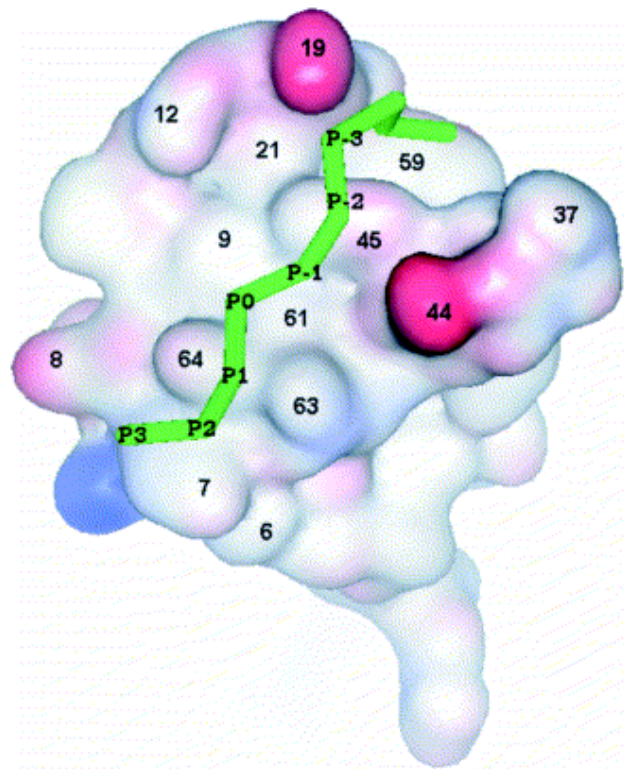


Abb.1.11: Oberflächenmodell einer SH3-Domäne (Beispiel: Abl-Tyrosin-Kinase, s.Kapitel 1.10) mit passendem Ligandenrückgrat, dargestellt in grün. Negative Seitenketten in rot, positive in blau abgebildet. P0 repräsentiert die Position des ersten Prolins des Liganden (Cesareni et al., 2002)

von der Positionierung einer Abfolge basischer Aminosäuren (z.B. Arginin) gegenüber der SH3-Domäne bei der Bindung bestimmt werden. Liganden, die über diese basische Sequenz am N-Terminus (z.B. RxLPP#P, wobei # eine hydrophobe Seitenkette bedeutet) verfügen, binden an die entsprechenden SH3-Domänen mit einer Amino-Carboxyl-Ausrichtung und werden Klasse 1 Liganden genannt. Befindet sich die basische Sequenz am C-Terminus der Consensus-Sequenz (z.B. Px#PxR), so bindet diese die SH3-Domäne in Carboxy-Amino-Ausrichtung und wird als Klasse 2 Ligand bezeichnet (Feng et al., 1994). Adapterproteine, die auf SH3/SH2-Domänen basieren, wie Grb2, Crk oder Nck, binden vorzugsweise Klasse 2 Liganden (Sparks et al., 1996).

Nach einer Studie über das Binde-Potential des gesamten SH3-Repertoires aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine Einteilung der Liganden in mehrere andere

Gruppen durchgeführt. Die ersten beiden beschriebenen Klassen von Liganden, Klasse 1R und 2R, an die die Mehrzahl der SH3-Domänen binden, entsprechen den oben genannten Arginin-flankierten Consensus-Sequenzen. 2 weitere identifizierte Klassen sind 1K mit der Erkennungssequenz +xxPxxP und 2K mit dem Bindungsmotiv PxxPx+. Das + steht hier für eine N- bzw. C-terminal ausgerichtete spezifitätsbestimmende Sequenz basischer Aminosäuren, die mehr oder weniger lang sein kann. Eine klare Klasseneinteilung ist nur begrenzt möglich, da viele SH3-Domänen mehrere Liganden unterschiedlicher Klassen binden (Cesarini et al., 2002). Darüber hinaus sind zahlreiche Ausnahmen bekannt, die das Modell der erläuterten Consensus-Sequenz betreffen. Amphiphysin-1 z.B., ein Dynamin-bindendes Protein, das bei der Endozytose eine Rolle spielt, bevorzugt Klasse II Peptide, die ein Arginin anstelle der aliphatischen Aminosäure an Position P0 (siehe Abb.1.5) tragen (Cestra et al., 1999). Eine weitere Ausnahme stellt Eps8 dar, welches an anderer Stelle noch erläutert wird.

Zusätzlich zu den bindungsrelevanten Eigenschaften der beteiligten Aminosäureseitenketten in der SH3-Bindungsstelle können andere Seitenketten der Domäne die Spezifität dieser verändern (Fazi et al., 2002). Eine variable Länge der RT-Schleife (benannt nach den häufig enthaltenen Aminosäuren Arginin und Threonin) innerhalb der SH3-Domäne beispielsweise beeinflusst in hohem Maße die Lage der an der Oberfläche exponierten Seitenkette (Position 21 am Beispiel der Abl SH3-Domäne in Abb.1.5) und somit die Spezifität der Domäne.

Die durchschnittliche Affinität von SH3-Domänen gegenüber optimalen synthetischen Liganden beträgt 10µM. Wobei für einige SH3-Domänen aber auch Affinitäten von unterhalb 1µM beobachtet wurden (Posern et al., 1998). Damit handelt es sich im Vergleich zu anderen Protein-Protein-Interaktionen um verhältnismäßig schwache Bindungen. Die so gegebene Kombination aus hoher Spezifität und geringer Affinität macht SH3-Domänen zu einem geeigneten zellulären Werkzeug für dynamische Signalprozesse, wie der Regulation des Aktinzytoskeletts.

1.9 Nck Adapterproteine

Die Proteine der Nck-Familie stellen eine bedeutende Gruppe von SH3-Adaptoren in Verbindung mit der Signalgebung zum Aktinzytoskelett dar. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der weiteren Aufklärung der Funktion der Ncks im Bezug auf die WASP/Scar-Proteine.

Die Mitglieder der Nck-Proteinfamilie sind Nck1 und Nck2 in humanen Zellen, deren Analoga in der Maus (mNck α und mNck β bzw. Grb4) sowie Dock in Drosophila (Chen et al., 1998; Braverman und Quilliam, 1999; Coutinho et al., 2000). Die Domänenstruktur ist in allen Proteinen der Familie gleich. Sie setzen sich aus 3 SH3-Domänen und einer SH2-Domäne am C-Terminus zusammen (Lehmann et al., 1990). Die Sequenzen von Nck1 und Nck2 stimmen zu 68% überein, wobei die SH2- und SH3-Domäne bis zu 90% konserviert sind (Chen et al., 1998). Beide Isoformen werden ubiquitär exprimiert.

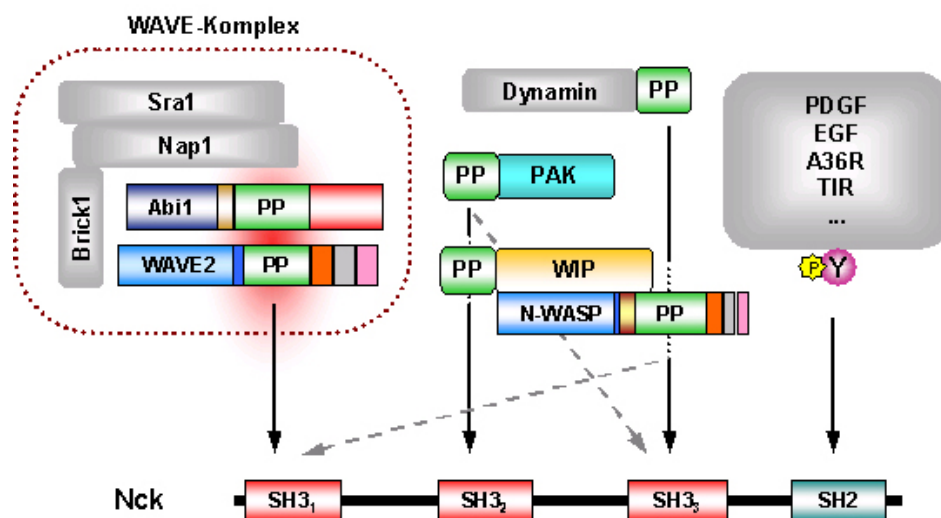


Abb.1.12: Domänenstruktur von Nck mit einigen bekannten Bindungspartnern. Die SH2-Domäne bindet an phosphorylierte Tyrosine von z.B. Wachstumsfaktoren. Die dritte SH3-Domäne bindet an Prolin-reiche Sequenzen in N-WASP oder Dynamin. Die zweite SH3-Domäne leistet durch Bindung von WIP einen weiteren Beitrag zur N-WASP-Rekrutierung oder kann an PAK binden. Die erste SH3-Domäne interagiert mit einer der Prolin-reichen Sequenzen des WAVE-Komplex, d.h. entweder Abi1 oder WAVE. Wann genau diese Interaktion stattfindet und ob WAVE oder Abi1 hauptinteraktionspartner sind, soll mit dieser Arbeit geklärt werden.

Über die SH2-Domäne ist Nck in der Lage, an aktivierte Rezeptor Tyrosin-Kinasen, wie den PDGF-R zu binden (Li et al., 1992). Die Bindungssequenz für Ncks ist PxYDEVsxE und liegt im PDGF-Rezeptor bei Y1009 (Frese et al., 2006). Eine weitere mögliche indirekte Interaktion von Nck und PDGF-R über p130^{Cas} wurde ebenfalls beschrieben (Rivera et al., 2006). Unabhängig davon, ob nun eine direkte oder indirekte Interaktion vorliegt, können über die drei SH3-Domänen Signale von den RTKs an verschiedene nachfolgende Signalwege übermittelt werden. Einige der bekannten Signalwege, an denen Nck beteiligt ist, betreffen auch oder ausschließlich das Mikrofilamentsystem. Ein Beispiel hierfür ist die intrazelluläre Beweglichkeit des *Vaccinia* Virus. Die SH2-Domäne von Nck bindet an das phosphorylierte Tyrosin 112 des viralen Oberflächenproteins A36R. Der Aktin-Nukleationsfaktor N-WASP wird dabei im Komplex mit WIP und Nck an die Virsoberfläche rekrutiert (Frischknecht et al., 1999). Ein weiteres Beispiel für eine Ausnutzung dieses Nck-Signalweges ist die Rekrutierung von Nck über den eingeschleusten Intiminrezeptor Tir durch Bakterien des *Escherichia coli*-Stammes EPEC (enteropathogenic *E.coli*). Tir wird in die Wirtszelle über ein TypIII Sekretionssystem injiziert, dort in die Zellmembran integriert und bindet an das bakterielle Oberflächenprotein Intimin. Nck bindet ein Motiv um das phosphorylierte Tyrosin 474 von Tir und rekrutiert so N-WASP/WIP, welches den Arp2/3-Komplex aktiviert. Resultat ist eine sockelförmige Ausstülpung der Zellmembran auf der das Bakterium verbleibt (s.Abb 1.13). Anhand dieser beiden Modellsysteme wurde die eigentliche zelluläre Funktion von Nck zur Rekrutierung von N-WASP und dem Arp2/3-Komplex an phosphorylierte Tyrosine entdeckt. Es wurde beschrieben, dass alle drei SH3-Domänen für eine maximale Effizienz bei der Aktivierung von N-WASP notwendig sind. Aufgrund von Versuchen mit Deletionsmutanten wird angenommen, dass die am stärksten an N-WASP bindende zweite SH3-Domäne sowohl für die Bindung als auch für die Aktivierung zuständig ist, während die anderen beiden in

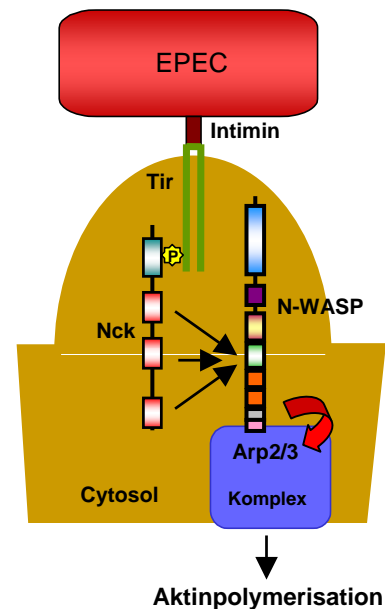


Abb.1.13: Aufbau eines „EPEC-pedestal“. Schematische Darstellung der Bildung eines sogenannten „pedestal“ im Zuge der Infektion einer Zelle mit dem enteropathogenic *E.coli* EPEC

Korporation mit der zweiten entweder die Bindung stärken (SH3#3) oder zusätzliche Energie für die Aktivierung verfügbar machen (SH3#1; Rohatgi et al., 2001). Allerdings wird inzwischen davon ausgegangen, dass N-WASP konstitutiv an WIP bindet (Moreau et al., 2000; Ho et al., 2001; Ho et al., 2004) und dass die zweite SH3-Domäne von Nck indirekt über WIP mit N-WASP in Kontakt steht (Anton et al., 1998).

Weitere mögliche Verbindungen von Nck mit dem Aktinzytoskelett stellen die Interaktionen mit Dynamin (Wunderlich et al., 1999) und der Familie der PAK Serin/Threonin-Kinasen dar, welche Effektoren von Rac und Cdc42 sind. Die zweite SH3-Domäne ist für letztere Interaktion essentiell, aber *in vivo* werden für eine maximale Bindungsstärke die zweite und dritte SH3-Domäne gebraucht (Galisteo et al., 1996). Insbesondere die von Miki et al. (1999) beschriebene Ser/Thr-Phosphorylierung von WAVE infolge einer Stimulation des PDGF-Rezeptors (Kapitel 1.6) deutet auf einen möglichen Zusammenhang mit Rac-vermittelten Lamellipodien hin. In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit konnte der WAVE-Komplex in GST-Pulldown-Experimenten mit der ersten SH3-Domäne von Nck angereichert werden. Neben den bekannten Interaktionen von Nck mit dem PDGF-Rezeptor über die SH2-Domäne und den Pak-Ser/Thr-Kinasen über die zweite und dritte SH3-Domäne kann hieraus auf eine direkte Interaktion von Nck mit dem gesamten WAVE-Komplex geschlossen werden. Die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten von Nck sind in Abbildung 1.12 zusammengefasst.

1.10 Abi1

Ein weiteres Adapterprotein mit einer SH3-Domäne und bekannten Verbindungen zum Aktin Zytoskelett ist das Abl-interacting protein Abi1. Abi1 wurde von Shi et al. (1995) als Bindungspartner und Regulator von Abl, einer Familie von zytoplasmatischen Tyrosin-Kinasen mit Aufgaben in der Signalvermittlung von Wachstumsfaktor- und Adhäsionsrezeptoren an Zytoskelettstrukturen, beschrieben. (Shi et al., 1995; Review Hernández et al., 2004). Diese Interaktion findet über die SH3-Domäne von Abl mit einer Prolin-reichen Region in Abi1 statt (Dai und Pendergast, 1995). Es wird in Mäusen mit leichten Anreicherungen in Knochenmark,

Milz und Gehirn ubiquitär exprimiert und konnte in exprimierenden Zellen lokalisiert werden (Stradal et al., 2001; Steffen et al., 2004).

Das Protein, schematisch dargestellt in Abb.1.14, besteht aus einer C-terminalen SH3-Domäne gefolgt von einer Prolin-reichen Region und einer zentral gelegenen Homeobox-Homologie-Domäne. N-terminal befindet sich zudem eine für Abi1 spezifische funktionelle *coiled coil* Region (Shi et al., 1995). Diese Region interagiert direkt mit der WHD-Domäne von WAVE2 (Innocenti et al., 2004), und integriert Abi1 so in den WAVE-Komplex. *Drosophila*-Zellen, in welchen mit RNAi die Expression von Abi1 blockiert wurde, zeigen stark reduzierte Lamellipodienbildung. Die gleiche Eigenschaft zeigen Zellen mit inhibierter WAVE-Expression. Daraus wurde geschlossen, dass die Bindung des Abi1 N-Terminus an WAVE für die Lamellipodienbildung essentiell ist (Kunda et al., 2003).

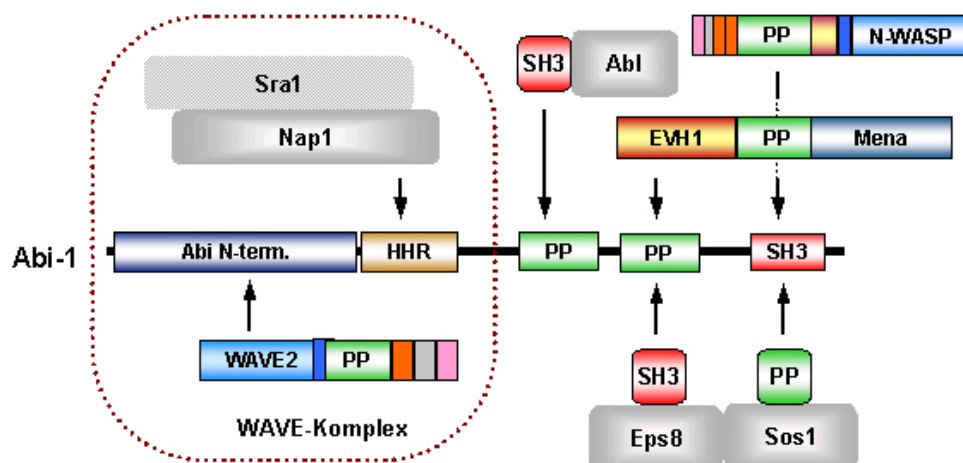


Abb.1.14: Domänenstruktur von Abi1 mit einigen bekannten Bindungspartnern. Der N-Terminus interagiert mit WAVE und Nap1 und integriert Abi1 in den WAVE-Komplex. Über die Prolin-reichen Regionen können z.B. SH3-Domänen von Abl und Eps8 bzw. die EVH1-Domäne von Mena binden. Die SH3-Domäne von Abi1 kann an die Prolin-reiche Region von Sos1 binden und es so mit Eps8 in Kontakt bringen. Ferner interagiert Abi1 über seine SH3-Domäne mit Prolin-reichen Sequenzen in N-WASP oder auch Ena/VASP-Proteinen.

Die SH3-Domäne von Abi1 bindet an Sos1 (Scita et al., 1999; Fan und Goff, 2000), einen GEF, der sowohl spezifisch für Rac als auch für die GTPase Ras sein kann. Sos1 interagiert zudem mit dem SH3-Adapter Grb2 (Chardin et al., 1993), wobei dieser an die gleiche C-terminale Polyprolin-Sequenz, nämlich VPVPPVPPRRR, bindet, wie Abi1 mit seiner SH3-Domäne (Li et al., 1993; Scita et al., 1999). Dabei ist

die Spezifität von Sos1 gegenüber Rac oder Ras abhängig davon, ob es Abi1- oder Grb2-gebunden vorliegt. Die Bindung an Abi1 hat eine exklusive GEF-Spezifität von Sos1 für Rac zur Folge, während die Bindung an Grb2 eine Spezifität von Sos1 für Ras bewirkt. Somit besteht eine Kompetition zwischen Grb2 und Abi1 um Sos, was Abi1 in Abhängigkeit von Eps8 (siehe Kapitel 1.11.1) zu einem limitierenden Faktor für die Aktivierung der GTPase Rac und damit des „membrane-ruffling“ macht (Innocenti et al., 2002). Eine weitere Interaktion von Bedeutung für das Aktinzytoskelett ist die Fähigkeit von Abi1 über seine SH3-Domäne an N-WASP zu binden (Innocenti et al., 2005). Aufgrund dieser vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten ist Abi1 ein zentraler Faktor für die Regulation der Motilität von Zellen.

1.11 Weitere SH3-Adaptoren

1.11.1 Eps8

Eps8 wurde über seine Rolle in der Vermittlung von mitogenen Signalen durch den EGF-Rezeptor erstmals beschrieben (Fazioli et al., 1993). Zudem werden über Eps8 die Wachstumsfaktorsignale an die Aktinorganisation weitergegeben (Scita et al., 1999; Offenhäuser et al., 2004). Die Domänenstruktur umfasst eine N-terminale Phospho-Tyrosin-Bindungsdomäne (PTB) gefolgt von mehreren Prolin-reichen Regionen, einer zentral gelegenen SH3-Domäne, einer weiteren Prolin-reichen Region und der sogenannten „Effektor-Domäne“ am C-Terminus (Review DiFiore und Scita, 2002). Eps8 ist Hauptvertreter einer 4-Gen Familie, von denen 3 – Eps8, E8L1 und E8L2 – gut konserviert und ähnlich sind.

Für die Organisation des Aktinzytoskeletts und dort speziell bei der Aktivierung von Rac spielt Eps8 zwei wesentliche Rollen. Zum einen aktiviert es mit seiner Effektordomäne die Rac-GEF-Aktivität von Sos1 (s.o.). Die Aktivierung von Sos1 erfolgt nach Binden der SH3-Domäne von Eps8 an die Prolin-reiche Region von Abi1 (Bindungsmotiv: PPPPPVDYTEDEE; Moniovi et al., 1999). Damit entsteht ein Komplex, in den Abi1 als Adapter Eps8 und Sos1 miteinander funktionell verbindet. Die andere grundlegende Funktion von Eps8 betrifft seine direkte Rekrutierung an das Mikrofilamentsystem. Diese erfolgt durch Binden der Effektorregion an F-Aktin (Scita et al., 2001). Eps8 hat zwei unterschiedliche Aktivitäten, die beide von dieser C-terminalen Region ausgehen, eine *capping*-Aktivität (Disanza et al., 2004) und eine Bündelungsaktivität (Disanza et al., 2006), welche im Zusammenhang mit der Bindung an den Adapter IRSp53 (s.u.) zu Tage tritt. Die genauen zellulären

Vorgänge, die die unterschiedlichen Eps8-Aktivitäten involvieren, sind jedoch noch nicht annähernd erforscht.

1.11.2 IRSp53

IRSp53 wurde als Insulin Rezeptor Tyrosin-Kinase Substrat mit einer Größe von 53kD identifiziert (Yeh et al., 1996). Seine genaue Funktion im Zusammenhang mit der Insulin Rezeptor Tyrosin-Kinase ist noch weitgehend unklar. Neben IRSp53 existieren noch 2 weitere Isoformen, IRTKS und FLJ22582 (Yamagishi et al., 2004). IRSp53 kann sowohl in den Spitzen von Lamellipodien als auch in denen von Filopodien gefunden werden. Aufgebaut ist IRSp53 aus 3 Domänen, der N-terminalen Rac-Bindungsdomäne (Miki et al., 2000), des zentral gelegenen unvollständigen aber funktionellen CRIB-Motivs (siehe WASP/N-WASP) (Krugman et al., 2001) und der C-terminalen SH3-Domäne, die unter anderem an WAVE2, Mena und Eps8 binden kann (Miki et al., 2000; Krugmann et al., 2001; Funato et al., 2004). Außerdem befinden sich sowohl N- als auch C-terminal der SH3-Domäne Prolin-reiche Regionen als potentielle SH3-Bindungsstellen.

Die Kombination dieser Domänen würde also eine Kopplung von entweder Rac oder Cdc42 mit WAVE2 und Mena ermöglichen. Da WAVE keine GTPasen-bindende Domäne enthält, *in vivo* aber durch Rac reguliert wird, wurde ursprünglich angenommen, dass IRSp53 aufgrund dieser Eigenschaften und einer beobachteten Aktivierung der Aktinpolymerisation als Bindeglied zwischen Rac und WAVE fungiert. Der resultierende putative Rac/IRSp53/WAVE2-Komplex wurde somit für den Vorschub der Membran und das „membrane-ruffling“ verantwortlich gemacht (Miki et al., 2000; Miki und Takenawa, 2002). Allerdings haben spätere Ergebnisse verdeutlicht, dass die Signalübertragung von Rac zu WAVE über einen Komplex aus Sra1, Nap1 und Abi1 abläuft (Eden et al., 2002; Rogers et al., 2003; Kunda et al., 2003; Steffen et al., 2004; Innocenti et al., 2004). Die genaue Funktion von IRSp53 im Hinblick auf den WAVE-Komplex ist weiterhin unklar. Die Funktion der Interaktion mit Mena ist ebenfalls nicht ganz verstanden, zumal IRSp53 zusammen mit WAVE unabhängig von Mena an Lamellipodienspitzen lokalisiert (Nakagawa et al., 2003). Eine mögliche Rolle für Filopodienbildung (Krugmann et al., 2001) muss noch genauer untersucht werden. Zudem wurde Eps8 als prominenter Interaktor von IRSp53 im selben Zusammenhang beschrieben (Disanza et al., 2006).

1.12 Ena/VASP-Proteine

Eine weitere Gruppe von Regulatoren des Aktinzytoskeletts sind die Ena/VASP-Proteine. Das erste identifizierte Mitglied dieser Gruppe ist das Vasodilator-Stimulierte Phosphoprotein (VASP). VASP wurde zunächst als Substrat für cAMP- und cGMP-gesteuerte Proteinkinasen in Blutplättchen entdeckt (Waldmann et al., 1987). Kurz darauf wurde auf der Suche nach Hemmern von Abl-Mutanten (Abelson Tyrosinkinase) in *Drosophila* das strukturell ähnliche *Drosophila* Enabled (Ena) gefunden (Gertler et al., 1990). Zuletzt sind noch 2 weitere Proteine in Säugern charakterisiert worden, mammalian Enabled (Mena) und das Ena/VASP-Like Protein (EVL).

Die Ena/VASP-Proteine verfügen über einige strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten. Alle Mitglieder besitzen eine N-terminale EVH1-Domäne (Ena/VASP-homology 1), welche an Prolin-reichen Sequenzen binden (Niebuhr et al., 1997), und eine EVH2-Domäne am C-Terminus. Die Domänenstruktur und mögliche Interaktionspartner sind in Abb.1.15 dargestellt. Die EVH2-Domäne umfasst eine G- und eine F-Aktin Bindungsstelle, welche mit den WH2- (bzw. Verprolin-) Motiven verwandt ist, sowie eine Tetramerisierungs-Domäne. Natives VASP z.B. liegt aus diesem Grund als Tetramer vor. Zwischen diesen Domänen befindet sich eine Prolinreiche Region. Die Fähigkeit von VASP sowohl an G-Aktin als auch an F-Aktin zu binden und so die Aktinpolymerisation zu verstärken und Aktinfilamente zu bündeln wurde beschrieben (Bachmann et al., 1999; Huttelmaier et al., 1999; Walders-Harbeck et al., 2002) und neusten Erkenntnissen zufolge fungieren VASP und wahrscheinlich auch Mena und EVL als „Elongasen“ von Aktin bei der Polymerisation von Filamenten (Breitsprecher et al., 2008)

Über die Prolin-reiche Region, welche mehrere Wiederholungen des Motivs GPPPP enthält, sind Interaktionen mit mehreren SH3-Domänen möglich. So interagieren die SH3-Domänen der Tyrosinkinasen Abl und Src sowie IRSp53 mit dieser Region (Gertler et al., 1995; Ahern-Djamali et al., 1999; Krugmann et al., 2001; Tani et al., 2003). Ausserdem bindet das G-Aktin-bindende Profilin (siehe 1.3) an diese Struktur (Reinhard et al., 1995). Die EVH1-Domänen stellen eine für diese Arbeit nicht minder interessante Struktur dar. Sie ähneln den SH3-Domänen in ihrer Eigenschaft, an spezifische Prolin-reiche Regionen zu binden. Grundlegendes Erkennungsmerkmal sind Sequenzen mit dem Motiv F/LPPPP (Niebuhr et al., 1997). Ebenso binden sie

Ena/VASP-Proteine tragen dazu bei, durch Verlängerung der Aktinfilamente, eine verstärkte Arp2/3-vermittelte Aktinfilamentnukleation und Stabilisierung der Filamentstruktur die intrazelluläre Motilität von *Listeria* zu erhöhen.

1.13 PAKs

Die erste p21-aktivierte Kinase (PAK) wurde auf der Suche nach Rac-Interaktoren entdeckt. In diesem Zusammenhang wurde eine Abhängigkeit der Aktivität dieser Serin-/Threonin-Kinase von GTPasen der Rho-Familie, nämlich Rac und Cdc42, festgestellt, welche in aktiviertem Zustand die Aktivität der beschriebenen PAK stimulieren (Manser et al., 1994). Später wurden 2 Gruppen von PAKs charakterisiert, die konventionellen und die unkonventionellen PAKs. Die unkonventionellen PAKs sind in dieser Arbeit von geringerem Interesse, da sie zum Einen nicht durch Cdc42 oder Rac stimuliert werden, sondern vermutlich einem anderen Aktivierungsmechanismus unterliegen, und zum Anderen im Gegensatz zu den konventionellen PAKs über keine SH3-Bindungsstelle verfügen. Die konventionellen PAKs in humanen Zellen, PAK1, PAK2 und PAK3 (α PAK, γ PAK und β PAK in Ratten) weisen eine konservierte Domänenstruktur auf. C-terminal befindet sich die Kinase-Domäne, gefolgt von einer Verbindungsregion, in der eine SH3-Bindungsstelle für den Rac/Cdc42-GEF PIX (PAK-interacting exchange factor) liegt. Am anderen Ende dieser Verbindungsregion liegt eine Kinase-inhibierende (KI) Domäne mit direktem Übergang in eine Cdc42/Rac-interagierende Bindungsdomäne (CRIB). Am N-Terminus sind 2 weitere klassische SH3-Bindungsmotive zu finden, an die die Adapterproteine Nck und Grb2 binden können. In der Zelle liegt PAK1 als trans-inhibiertes Homodimer vor, in welchem die KI-Region eines Moleküls an die Kinasedomäne des anderen bindet (Parrini et al., 2002). Durch die Bindung einer GTPase an die CRIB-Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung in der KI-Region, wodurch die Interaktion mit der Kinasedomäne und die daraus resultierende Inhibition unterbrochen wird und eine zur vollständigen Aktivierung nötige Autophosphorylierung ermöglicht wird (Lei et al., 2000).

Die Effekte der Aktivität konventioneller PAKs auf Proteine mit einer Funktion für das Aktinzytoskelett sind zahlreich. So sind die PAKs Effektoren der wichtigen Aktinzytoskelettregulatoren Rac und Cdc42, binden mit ihrem zentralen SH3-

Erkennungsmotiv an den Rac/Cdc42-GEF PIX, welches in den Fokalkontakten zu finden ist (Zegers et al., 2003). Dies wiederum führt zu einer verstärkten Rac-Aktivierung, also einen klassischen positiven *feedback loop* von Rac zu Rac darstellt. Mit den N-terminalen Polyprolin-Regionen bindet PAK an die ebenfalls im Aktinzytoskelett relevanten Adapterproteine Nck und Grb2. Die Interaktion mit Nck findet über die zweite SH3-Domäne statt. Über die SH2-Domänen dieser Adaptoren können die PAKs wie N-WASP an membranständige Rezeptortyrosinkinasen rekrutiert werden (Galisteo et al., 1996). Nach der gängigen Modelldarstellung ist die Interaktion von Nck und PAK wichtig, um über die weiteren SH3-Domänen von Nck die Substrate an aktives PAK zu rekrutieren. Die in der vorangegangenen Diplomarbeit beschriebene Fähigkeit von Nck zur Interaktion mit dem WAVE-Komplex bedeutet somit eine weitere mögliche Verbindung von PAK über Nck mit dem Aktinzytoskelett. Ausserdem werden 2 mögliche direkte Verbindungen von PAK1 bzw. PAK2 zu Abi1 beschrieben. Zum Einen wird PAK eine inhibitorische Wirkung auf Calpain zugeschrieben, was den Abbau von Abi1 nach Serum-Entzug von Zellen verlangsamen soll (Chi et al., 2004). Zum Anderen wird Abi1 eine Interaktion seiner SH3-Domäne mit dem ersten PXXP-Motiv von PAK2 zugeschrieben, an das auch Nck bindet. Eine Mutation in diesem Motiv hat einen Defekt in der PDGF-induzierten Ausbildung von dorsalen Ruffles (siehe Kapitel 1.6) zur Folge (Machuy et al., 2007).

1.14 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Regulation des Aktinzytoskeletts unterliegt einer Vielzahl von Faktoren, von denen ein großer Teil noch nicht abschließend geklärt ist. So existiert eine große Zahl von Signal- und Adapterproteinen, deren Einflüsse auf das Zytoskelett teilweise bekannt, deren Signalwege aber letztlich noch nicht verstanden sind. Zahlreiche Studien der letzten Jahre sowie die vorangegangene Diplomarbeit legen einen der Gründe hierfür dar. Viele der beteiligten Proteine haben mehr als nur eine Funktion. Bei einigen, wie z.B. den Adapterproteinen der Nck-Familie, ist bei weitem noch nicht klar, welche der *in vitro* beobachteten potentiellen Interaktionen *in vivo* eine Rolle spielen. Die genannte Diplomarbeit beschränkte sich auf die Betrachtung von *in vitro* SH3-Polyprolin-Interaktionen von Proteinen der WASP/Scar-Familie mit SH3-Adaptoren sowie der Adaptoren untereinander. Diese Interaktionen stellen einen der

Schlüsselmechanismen für die Regulation der Arp2/3-abhängigen Aktinreorganisation dar. Es wurden GST-Pulldown-Experimente durchgeführt, bei denen isolierte SH3-Domänen als Köder für überexprimierte mögliche Bindungspartner eingesetzt worden sind. Die erhaltenen Ergebnisse, bestätigten bekannte Interaktionen aber ergaben auch einige bis dahin unbekannte potentielle Bindungsvarianten und verdeutlichen die Komplexität der Netzwerke des beteiligten Proteine (s.Abb.1.16).

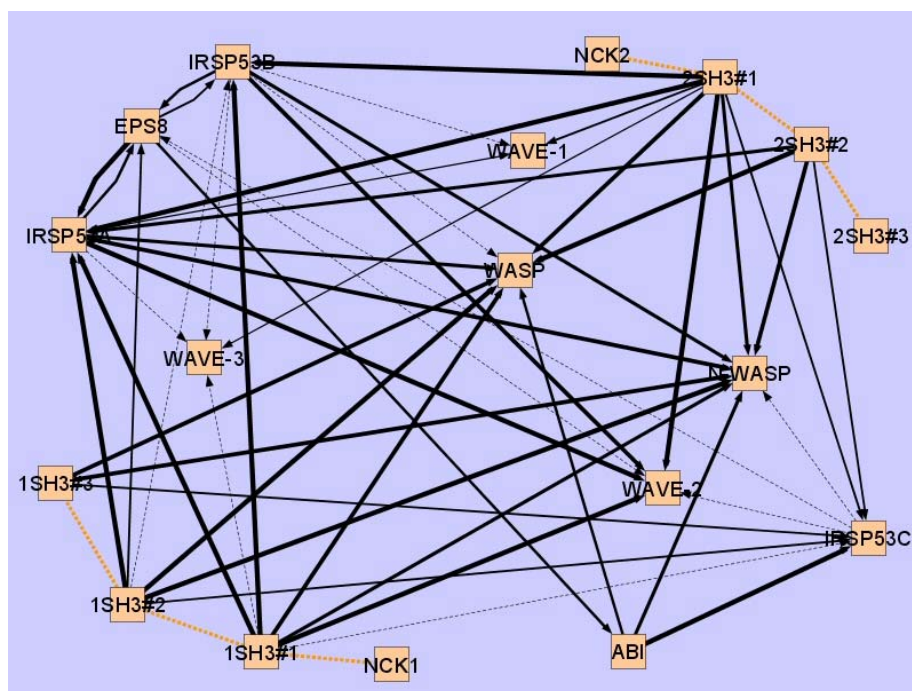


Abb.1.16: Übersicht über die in der vorangegangenen Diplomarbeit erhobenen Daten. Jeder Pfeil steht für eine beobachtete Interaktion einer SH3-Domäne mit der Prolin-reichen Region eines Zielproteins. Die Dicke des jeweiligen Pfeils gibt Auskunft über die relative Stärke der jeweils betrachteten Interaktion.

Die maßgebliche Rolle, die das Aktinfilamentsystem für die Motilität von Zellen, während der Embryogenese, im Immunsystem oder auch der Metastasierung von Krebszellen spielt, erfordert eine möglichst genaue Aufklärung der beteiligten Vorgänge.

In dieser Arbeit soll der vorhandene Ansatz weiterbearbeitet werden, um eine zeitlichen und räumlichen Auflösung einzelner Interaktionen *in vitro* und *in vivo* zu erzielen. Zuerst soll das etablierte Verfahren der *in vitro* Bindungsstudien auf die EVH1-Domänen der Ena/VASP-Proteine ausgedehnt werden. Ein besonderer zellbiologischer Schwerpunkt wird auf die zuvor beobachtete Interaktion der ersten SH3-Domäne von Nck mit dem WAVE-Komplex gelegt.

N-WASP wird über Nck an phosphorylierte Tyrosine rekrutiert, aktiviert dort den Arp2/3-Komplex und induziert so Aktinpolymerisation. Dies findet in Zellen wahrscheinlich während der Clathrin-vermittelten Rezeptor-Internalisierung statt. Der WAVE-Komplex kann dort nicht nachgewiesen werden. Es ist also davon auszugehen, dass die beobachtete Nck/WAVE-Komplex-Interaktion eine andere Funktion hat. Es gilt, diese Interaktion näher zu charakterisieren und ihre genaue Funktion zu untersuchen. Der WAVE-Komplex lokalisiert während der Arp2/3-Komplex-Aktivierung an lamellipodialen Spitzen, wo er wiederum nicht mit Nck ko-lokalisiert. Daher wird hier die Frage gestellt, wo Nck/WAVE-Komplex-Interaktionen in der Zelle stattfinden und welche funktionelle Rolle damit verbunden ist.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Biolabs, BioRad, Boehringer Mannheim, Difco, Fluka, Gibco BRL, Höchst, LifeTechnologies, Merck, Millipore, New England Biolabs, Promega, Qiagen, Riedel de Haen und Sigma bezogen. Alle Substanzen haben, sofern nicht anders angegeben, die Reinheitsgrade 'p.a.' bzw. 'reinst'. Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser angesetzt, welches mit einem Milli-Q-System (Millipore) aufbereitet wurde.

2.2 Bakterienstämme

Escherichia coli: TG2 (Stratagene)
BL21 CodonPlus™ (DE3) RIL Competent Cells (Stratagene)

2.3 Bakterienkulturmedien und Zusätze

Alle Medien für die Bakterienkultur wurden durch Autoklavieren (30 min., 121°C) sterilisiert. Hitzeempfindliche Medienkomponenten und Zusätze wie Glucose oder Antibiotika wurden sterilfiltriert und zum autoklavierten Medium hinzugegeben.

LB-Medium ('Luria Bertani broth'):	Bacto-Trypton	10	g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5	g/l
	NaCl	120	mM

SOC-Medium:	Bacto-Trypton	20	g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5	g/l
	NaCl	10	mM
	KCl	2,5	mM
	MgCl ₂	10	mM
	MgSO ₄	10	mM
	Glucose	20	mM

Die Magnesium-Salze wurden separat autoklaviert und vor Gebrauch aus einer Stammlösung zugesetzt.

Agarplatten: 16 g Bacto-Agar in 1 l LB-Medium

Nach Abkühlen des autoklavierten Agarmediums auf ca. 45°C wurden Antibiotika-Stammlösungen hinzugegeben und das Medium in Petrischalen gegossen.

Ampicillin	100	µg/ml
Kanamycin	25	µg/ml

2.4 Bakterienkulturbedingungen

Zur Anzucht von *E.coli* wurden je 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 180-200 rpm über Nacht bei 37°C inkubiert. Für größere Flüssigkulturen wurden 5 ml LB-Medium als Vorkultur mit einer Einzelkolonie beimpft und wie beschrieben über Nacht inkubiert. Die Vorkultur wurde zum benötigten Volumen LB-Medium gegeben und bis zu der gewünschten optischen Dichte im Schüttelinkubator (180 rpm, 37°C) inkubiert.

LB-Agarplatten wurden mit 50 – 150 µl einer *E.coli*-Suspension versetzt und gleichmäßig bis zum Eintrocknen der Flüssigkeit mit einem Drigalski-Spatel oder einer 10ml Glaspipette auf der Agarplatte verteilt. Die Inkubation der Platten erfolgte ü. N. bei 37°C.

Geräte: Inkubationsschüttelmaschine (Multitron, Infors)
Umluft-Trockenschrank (UT6200, Heraeus)

2.5 Zellkultur

2.5.1 Medien und Lösungen

Alle Medien für die Zellkultur wurden sterilfiltriert (Steritop, Millipore).

Medien:

Wachstumsmedium B16:	DMEM (Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium) 4,5 g/l Glucose (Gibco) mit 10% (v/v) FCS „EU“ (PAA), 2 mM L-Glutamin (Gibco), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S)
Wachstumsmedium NIH3T3:	DMEM (Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium) 4,5 g/l Glucose (Gibco) mit 10% (v/v) FCS „#047K3395“ (Sigma), 2 mM L-Glutamin (Gibco), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S)
Wachstumsmedium Nck k.o.:	DMEM (Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium) 4,5 g/l Glucose (Gibco) mit 10% (v/v) FCS „#101K3361“ (Sigma), 2 mM L-Glutamin (Gibco), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S)
Wachstumsmedium ES-cell:	DMEM (Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium) 4,5 g/l Glucose (Gibco) mit 10% (v/v) FCS (Firma Biochrom; getestet für ES-Zellkultur in der Gruppe Experimentelle Immunologie unter Werner Müller), 2 mM L-Glutamin (Gibco), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S), 1% (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren NEAA (Gibco), 1 mM Natrium-Pyruvat (Gibco), 400µg/ml G418* (Sigma), 2µM Gancyclovir* (Hersteller unbekannt)

*: nur im Selektionsmedium

Lösungen:

- PBS (Phosphate-Buffered-Saline):

NaCl	140	mM
KCl	2,7	mM
Na ₂ HPO ₄	10	mM
KH ₂ PO ₄	1,8	mM
pH 7,4		

- Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S):

Penicillin	5000	U/ml
Streptomycin	5000	µg/ml

Die P/S-Lösung (Gibco) wurde als Kontaminationsschutz den Medien 1:100 zugesetzt.

- 100 x Nicht-essentielle Aminosäuren, Gibco (Endkonzentration 1 x)
- 100 mM Natrium-Pyruvat, Gibco (Endkonzentration 1 mM)
- Tetradecanoylphorbol 13-Acetat (TPA, Sigma), 1mg/ml Stocklsg., (Endkonzentration 1µg/ml)
- Platelet-derived growth factor (PDGF-BB, Sigma), 10µg/ml Stocklsg. in 4mM HCl, 0,1% (w/v) BSA, (Endkonzentration 10ng/ml)
- G418 (Sigma) 200mg/ml Stocklsg. in H₂O (Endkonzentration 400µg/ml davon 200µg/ml aktiv)
- Gancyclovir (Hersteller unbekannt), 2mM Stocklsg. (Endkonzentration 2µM)
- Gentamicin (Sigma), 50mg/ml Stocklsg. (Endkonzentration 50µg/ml)

2.5.2 Verwendete Zelllinien

- B16F1 Mausmelanomzelllinie (ATCC CRL-6323); Für diese Zellen wurde Wachstumsmedium „B16“ verwendet und die Kultur erfolgte bei 37°C und 7,5% CO₂
- NIH3T3 (Embryofibroblasten–Zelllinie Maus, ATCC CRL-1658); Für diese Zellen wurde Wachstumsmedium „NIH3T3“, sonstige Kulturbedingungen wie B16F1
- Immortalisierte Fibroblasten aus Nck1- und Nck2-defizienten Mausembryonen (E8.5): Nck^{del/del} (#19) bzw. Nck^{flox/del} (#13) zur Verfügung gestellt von T. Pawson (Bladt et al., 2003). Für diese Zellen wurde Wachstumsmedium „Nck k.o.“ eingesetzt und die Kultur erfolgte bei 37°C und 7,5% CO₂.

- Embryonale Stammzellen line IGD3.2 (Hitz et al., 2007); Für diese Zellen wurde Wachstumsmedium „ES-cell“ verwendet, sonstige Kulturbedingungen wie B16F1
- Feederzellen für ES-Zellen (Mouse embryonic fibroblasts, zur Verfügung gestellt von Martin Hafner). Fähigkeit zur Proliferation wurde durch Bestrahlung ausgeschaltet. Für diese Zellen wurde ebenfalls Wachstumsmedium „ES-cell“ verwendet, sonstige Kulturbedingungen wie B16F1

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Plasmide

pGEX-6P1 (Amersham Pharmacia Biotech)

pGEX-Plasmide als GST-Gen Fusionsvektoren dienen der induzierbaren, intrazellulären, bakteriellen Proteinexpression. Die Expression steht unter Kontrolle des lac-Promoters, der durch das Lactose-Analogon Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) induziert wird.

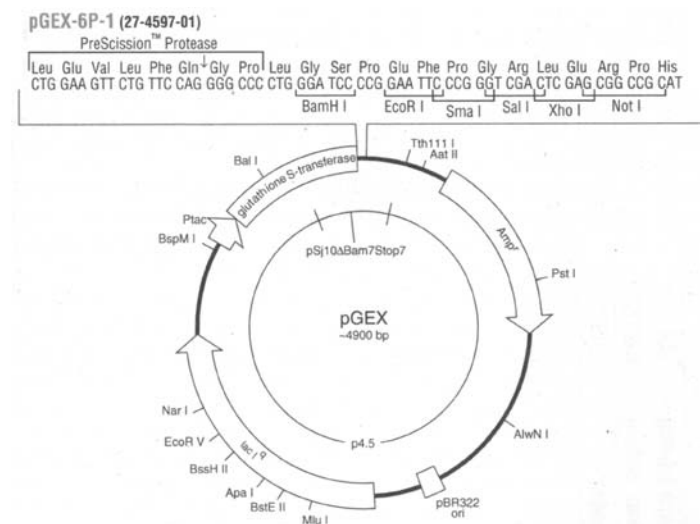


Abb.2.1: Plasmid-Karte des pGEX Fusionsvektors. Es sind die wichtigsten Abschnitte wie die 'multiple cloning site (MCS)', Antibiotikaresistenz, Promotor und Transkriptionsstartstelle (Ori) dargestellt. (nach GST Gene Fusion System, Amersham Pharmacia Biotech)

pEGFP-C1, -C2, -C3 (Clontech)

Mithilfe dieser Plasmide werden kodierende Sequenzen von zu beobachtenden Proteinen C-terminal an EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) fusioniert und zur Expression gebracht. EGFP emittiert bei Anregung mit Wellenlängen von ca. 490

nm stark grün fluoreszierendes Licht. pEGFP Vektoren dienen der Lokalisation von Proteinen *in vivo* und *in situ*.

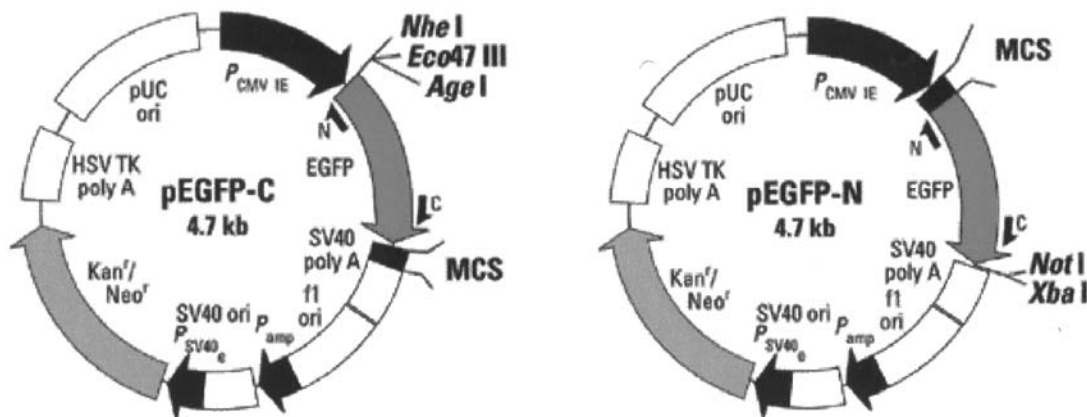


Abb.2.2: Plasmid-Karte der pEGFP-C und pEGFP-N Fusionsvektoren. Es sind die wichtigsten Abschnitte wie die 'multiple cloning site (MCS)', Antibiotikaresistenz, Promotor und Transkriptionsstartstellen (Oris) dargestellt. (nach Living Colors™ GFP Application Notes, Clontech Laboratories Ltd.).

pIRES (Clontech)

Der pIRES (Internal Ribosome Entry Site) Vektor ist ein bizistronischer Vektor, von dem über die zwei MCS zwei Gene gleichzeitig in Säugerzellen exprimiert werden können. Die beiden Gene sind dann über eine IRES-Sequenz verbunden, so dass nach der Translation kein Fusionsprotein entsteht, sondern zwei unabhängige Proteine. Die IRES-Sequenz wurde so modifiziert, dass das in MCS B befindliche Gen in geringerem Maße exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde ein pIRES-EGFP-Vektor verwendet, bei dem MCS B bereits mit EGFP (wie oben) belegt ist. Dadurch wird ermöglicht, dass zusätzlich zur Selektion über die vorhandenen Resistenzgene eine Sortierung per cell sorter erfolgen kann.

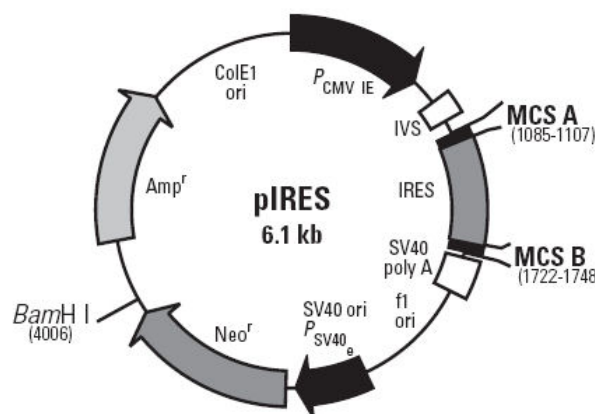


Abb.2.3: Plasmid-Karte des pIRES Vektors. Es sind die wichtigsten Abschnitte wie die IRES-Sequenz, die beiden 'multiple cloning sites (MCS)', Antibiotikaresistenzen, Promotoren (P) und Transkriptionsstartstellen (Oris) dargestellt. (nach Clontech Laboratories Ltd.).

pBluescript II SK (+-) Phagemid

Das Plasmid pBluescript ist für die Transformation in *E.coli*-Bakterien geeignet. Es hat eine Größe von 2961bp und stammt vom Plasmid pUC19 ab (Firma Stratagene). Das Plasmid trägt das Ampicillin-Resistenzgen (Ampr), den Replikationsursprung, das lacZ-Gen und einen Promotor für das lacZ-Gen. Durch das lacZ-Gen ist eine Blau-Weiß-Selektion der transformierten Bakterien möglich. Weiter hat das Plasmid eine multiple Klonierungsstelle (mcs). pBluescript diente als Ausgangskonstrukt für die in dieser Arbeit hergestellten gene-targeting Konstrukte.

pCR4-BLUNT-TOPO (Invitrogen, GenBank Accession Nr. AJ548468)

pCR4- BLUNT-TOPO-Plasmide als Klonierungsvektoren wurden bei direkter Klonierung von PCR-Produkten angewendet, die mit der Pfu-Polymerase amplifiziert wurden und damit glatte bzw. „blunt“-Enden aufwiesen. Das PCR-Produkt kann dabei ohne Modifikationen in den Vektor eingefügt und mit universellen Primern sequenziert werden.

2.6.2 Verwendete Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (BioSpring) sind in 5' → 3'-Richtung angegeben.

N1-5'	↓GGATCC↑ATGGCAGAAGTGGTGGTA (BamHI)
N1-3'	↓GAATTC↑ATCATGATAAATGCTTGA (EcoRI)
Nck2BamHI5'	GAGA↓GGATCC↑ATGACAGAAGAAGTTATTGTGATAG
Nck2EcoRI3'	GAGA↓GAATTC↑TCACTGCAGGGCCCTGACG
N2'38K'fwd	CGACTCCAAGACGAAGTGGCGGGTGAGGAACG
N2'38K'rev	CGTTCCTCACCCGCCACTTCGTCTTGGAGTCG
N148K fwd02	GGAGAAGTGCAGCGACGGTAAGTGGCGGGGCAGCTACAACG
N148K rev02	CCGATCTGCCCGTTGTAGCTGCCCCGCCACTTACCGTCGCTG
N2'234K'fwd	GAACGACCCCGAGAAGTGGAAATGCAAAAATGCCC
N2'234K'rev	GGGCATTTTTGCATTTCCACTTCTCGGGGTCGTTT
N2'310K'fwd	CGACTTCCTCATTAAAGGACAGCGAGTCCTC
N2'310K'rev	GAGGACTCGCTGTCCTTAATGAGGAAGTCG
A1PP5'EcoRI	GAGA↓GAATTC↑ACAAATCCTCCTACTCAGAAACC
A1PP3'Sall	GAGA↓GTCGAC↑ATAATTCTTGGGGGCCCAAG
EVL5'BamHI	GAGA↓GGATCC↑ATGAGTGAACAGAGTATCTG
EVL(fl)3' rev	GAGA↓GTCGAC↑CGTTGTGCTGATCCCACTTAG (Sall)

EVL(1-117)3'	GAGA [↓] GTCGAC [↑] CTCCTTCTTGAGAATTCATGATG (Sall)
VASP5'BamHI	GAGA [↓] GGATCC [↑] ATGGCCGAGACGGTCATCTG
abileft	CCCGGCTGAAGTTTGATTTC
abiright	CCTGGAATACGGAGTTAAAAGC
nsm5XhoI	CCCTAGAGTCGACATAACTTCG
(Oligo-Nucleotidprimer enthält keine XhoI-Schnittstelle sondern bindet 5' der XhoI-Schnittstelle des Herkunftsplasmids „rapidflirt“)	
nsm3Sall	CCC [↓] GTCGAC [↑] CACGAACCATAAACCATTC

Die Restriktionsschnittstellen, sofern vorhanden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das zugehörige Restriktionsenzym ist entweder in der Bezeichnung des Oligonukleotids oder in Klammern hinter der Sequenz vermerkt.

2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine automatisierte Methode zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Dies ermöglicht die Vervielfältigung kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen.

Das Prinzip der PCR-Reaktion ist ein Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension. Im ersten Schritt wird die DNA bei einer Temperatur von 95°C denaturiert. Anschließend binden die im Überschuß zugegebenen Primer bei einer Temperatur zwischen 50°C und 65°C an die DNA-Einzelstränge. Bei der Extension bindet dann eine hitzestabile DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert unter Verwendung der Nukleotide komplementäre DNA-Sequenzen.

Die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt sich nach jedem Zyklus. Die spezifische DNA-Sequenz vermehrt sich um den Faktor 10^5 - 10^7 bei 20-30 wiederholten Zyklen.

Um eine optimal ablaufende PCR zur ermöglichen, ist besonders die Auswahl der Reaktionsbedingungen und der Oligonukleotid-Primer entscheidend. Bei den Primern ist zu beachten, daß die Differenz der Schmelztemperatur zwischen den eingesetzten Primern nicht größer als 2°C ist und bei ca. 60°C liegt. Die Primerlänge sollte zwischen 20-30 Nukleotiden und einem GC-Gehalt von ca. 50% liegen.

Um eine stabile Bindung zwischen DNA und Primer zu ermöglichen, sollten die beiden endständigen Nukleotide Cytosin oder Guanin sein, da diese im Gegensatz zu Adenin und Thymin drei Wasserstoff-Brückenbindungen ausbilden.

Bei dem T3 Thermocycler (Biometra) wird die Deckelheizung bei 105°C betrieben, um das Kondensieren der Proben am Deckel des Reaktionsgefäßes zu vermeiden.

PCR-Ansatz :	10 x PWO-Puffer	5 µl
	dNTP-Mix (Stratagene)	0,2 mM
	Oligonukleotid-Primer	10 pM
	DNA	0,1- 0,2 µg
	PWO-Polymerase (Stratagene)	1 U
	H ₂ O	ad 50 µl

2.6.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen lassen sich doppelsträngige DNA-Moleküle Sequenz-spezifisch spalten. In Abhängigkeit von der erkannten und geschnittenen DNA-Sequenz entstehen dabei glatte Enden ('blunt ends') oder durch einen asymmetrischen Schnitt Enden mit überstehender einzelsträngiger DNA ('sticky ends'). Mit Restriktionsenzymen kann man DNA-Moleküle in reproduzierbare Fragmente zerlegen, die dann z.B. durch Agarosegelelektrophorese analysiert werden können (s. Kapitel 2.6.5).

Restriktionsendonukleasen binden enzymspezifisch an meist palindromartig angeordneten Erkennungssequenzen und schneiden innerhalb dieser Erkennungssequenz die DNA durch Spaltung von zwei Phosphodiester-Bindungen.

Es wurden Restriktionsendonukleasen der Firma Boehringer, MBI Fermentas oder New England Biolabs mit den jeweils empfohlenen 10x Puffern verwendet.

Restriktionsansatz:	DNA	3 - 7,5 µl
	10x Restriktionspuffer	1,5 µl
	Restriktionsenzym	2 U
	MilliQ-H ₂ O ad	15 µl

Der Ansatz wurde für 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von DNA-Stopp-Puffer oder Aufreinigung gestoppt. Das im Stopp-Puffer enthaltene EDTA chelatiert für die Enzyme notwendige zweiwertige Ionen, so daß die Enzyme nicht mehr funktionsfähig sind.

Stopp-Puffer:	30% Ficoll	0,5	ml
	250mM EDTA, pH 8,0	0,2	ml
	20% SDS	25	µl
	50x Tris/Acetat pH7,5	20	µl
	0,5% Xylenblau	80	µl
	0,5% Bromphenolblau	80	µl
	MilliQ-H ₂ O ad	95	µl

2.6.5 Agarosegelelektrophorese

Doppelsträngige, linearisierte DNA-Fragmente lassen sich entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld in einer Gelmatrix auftrennen. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Weitere Faktoren, die die Geschwindigkeit der DNA-Wanderung bestimmen, sind die Stromstärke des elektrischen Feldes, die Pufferbedingungen und die Agarose-Konzentration. Das Verfahren wird sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt. Um die DNA-Fragmente im Gel sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid zugegeben, das nach Interkalation in die DNA-Moleküle unter UV-Licht fluoresziert. Die Größe der Banden kann durch den Vergleich mit einem DNA-Marker festgestellt werden.

Zu 1x TAE-Puffer (für DNA-Fragmente über 800 Basenpaaren) wurde Sea Kem GTG Agarose (FMC Bioproducts) bis zu einer Endkonzentration von 0,8 - 2,5% gegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben und die Lösung in einen Elektrophoreseschlitten mit Kamm gegossen.

Nachdem die Lösung zu einem Gel erkaltet war, wurde dieses in eine Gelkammer gelegt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Der Kamm wurde entfernt und die Proben mit 1/5 Volumen 5x DNA-Stop-Puffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Standard-DNA-Marker zur Bestimmung der Fragmentgrößen

mit aufgetragen. Nach dem Anlegen des elektrischen Feldes wandert die negativ geladene DNA auf den positiven Pol zu. Die Elektrophorese erfolgte bei 60-70 V. Nach ausreichender Trennung der DNA-Fragmente wurde das Ergebnis photographisch festgehalten.

Geräte : Gelkammer (Gibco BRL) und Power-Supply (Biometra)

Lösungen und Marker :

5x DNA-Stopp-Puffer: s.o.

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA): Tris-Base 2 M (pH 7,5)
Na-Acetat 1 M
EDTA 50 mM

Marker-DNA: Smart-ladder (Eurogentec), 3 µl/Tasche

2.6.6 Southern-Blot

DNA genetisch veränderter ES-Zellen nach einem gene-targeting (siehe 2.8.9) wurden mit dem Southernblot analysiert. Bei dieser Technik kann analysiert werden, ob der targeting-Vektor durch homologe Rekombination spezifisch in die genomischen DNA integriert wurde. Dazu wird die DNA aus murinen embryonalen Stammzellen gewonnen, einem Restriktionsverdau unterzogen und nach der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente auf eine Membran überführt. Man macht sich dabei zunutze, dass die genetisch veränderte DNA zusätzliche Restriktionsschnittstellen trägt und sich deshalb die Länge der DNA-Stücke an dieser Stelle vom Wildtyp unterscheidet.

Die an die Membranoberfläche gebundene DNA wird mit einer mittels PCR amplifizierten, radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert, die spezifisch mit der DNA des Targeting-Vektors interagieren muss. Die radioaktive Markierung der unterschiedlichen Bandengrößen kann mit Hilfe eines Phosphoimagers sichtbar gemacht werden.

2.6.6.1 Gewinnung von genomischer DNA aus ES-Zellen

Für die Isolation von DNA aus ES-Zellen wurde Proteinase K (Roche) verwendet. 50µl Lysepuffer wurde auf die konfluent bewachsenen Vertiefungen einer 96-well-Platte gegeben und bei 60°C über Nacht in einer feuchten Kammer im

Wärmeschrank inkubiert. Am nächsten Morgen ließ man die Platte für 1h abkühlen, gab zur Fällung der DNA je 150 µl 100% Ethanol hinzu und inkubierte 2-3 Stunden bei Raumtemperatur, bis filamentöses DNA-Präzipitat sichtbar wurde. Danach wurde vorsichtig der Überstand abgegossen und dreimal mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen. Zum Trocknen wurde die Platte mit offenem Deckel etwa 60 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen.

Lysis-Puffer:	10 mM NaCl
	10 mM Tris-HCl, pH7,5
	10 mM EDTA
	0,5% Sarcosyl
	1 mg Proteinase K

2.6.6.2 Restriktionsverdau der genomischen DNA

50 µl Restriktionsverdau-Mix wurde in jede Vertiefung der 96-well-Platte gegeben und ü.N. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl 5x Stopp-Puffer (siehe oben) konnte die Mischung tiefgefroren oder aufs Gel aufgetragen werden.

Restriktionsverdau-Mix pro well:	5 µl 10x Restriktionspuffer
	10 U Restriktionsenzym
	45 µl H ₂ O

2.6.6.3 Auftrennung der genomischen DNA auf Agarose-Gel

Wie unter 2.6.5 geschildert, wurde die verdaute DNA auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und aufgrund der Größe des Gels bei 150 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel am UV-Transilluminator mit angelegtem Lineal fotografiert, um die ungefähre DNA-Menge abschätzen und nach dem Blotten die Größe der Banden bestimmen zu können.

2.6.6.4 Depurinierung der genomischen DNA

Um die verhältnismäßig großen DNA-Fragmente effektiv aus dem Gel auf eine Membran überführen zu können, wurden sie depuriniert. Dazu inkubierte man zunächst 15 Minuten mit 0,4 M Salzsäure, dann zweimal 15 Minuten mit 0,5 M Natronlauge / 1,5 M NaCl und neutralisierte abschließend zweimal 20 Minuten mit 0,5 M Tris / 3 M NaCl (pH 7,5). Bei diesem Vorgang kam es einerseits zu

Strangbrüchen, andererseits trennten sich die beiden DNA-Stränge und konnten so einfacher aus dem Gel auf die Membran übertragen werden.

2.6.6.5 Blotten

Die DNA wurde nach dem Prinzip des Kapillarblottens aus dem Gel auf eine Membran überführt. Dazu wurde eine Salzbrücke aus Filterpapier auf Glas zwischen zwei Wannen mit 0,2M NaOH angelegt, das vorbereitete 1%-Agarosegel darauf platziert, so dass überall unter dem Papier das getränkte Filterpapier lag, die zugeschnittene und markierte Membran (Hybond-N+, Amersham Biosciences) darauf gelegt und nochmals 3 Lagen Filterpapier auf die Membran gelegt. Zur Verstärkung der Kapillarkräfte wurde ein großer Stapel Papierhandtücher auf den Aufbau gelegt, der die komplette Gel/Membranfläche abdeckte. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass keine Kontakte zwischen Papierhandtüchern und der Salzbrücke oder dem Puffervorrat entstanden, damit die Flüssigkeit durch das Agarosegel wandert und so die DNA-Stücke mitgezogen werden. Der Aufbau wurde mit einigen Bleigewichten beschwert und der Blot ü.N. stehen gelassen.

Danach entnahm man die Membran, markierte mit Bleistift die Geltaschen, und trocknete sie anschließend 2 Stunden bei 80°C im Trockenschrank.

2.6.6.6 Markierung der Southern-Sonde

Beim Markieren der Southern-Sonde wurde das „Ladderman Labeling Kit“ (TaKaRa) verwendet. 1µl des zuvor mittels PCR hergestellten Sonden-templates, 11µl Wasser und 2µl der Sondenprimer wurden 3min. bei 95°C inkubiert und die doppelsträngige template-DNA somit aufgeschmolzen. Während den darauf folgenden 5-10min. Inkubation bei Raumtemperatur binden die in dem Ansatz enthaltenen Primer an die template-DNA. Jetzt wurden 2,5µl 10x Polymerase-Puffer, 2,5µl des dNTP-mix, 5µl mit radioaktivem ³²P markiertes dCTP und 1µl der im kit enthaltenen Bca-Polymerase zugegeben. Für 10min. bei 50°C erfolgte nun die Herstellung der radioaktiven Sonde entsprechend der template-DNA.

Das Produkt konnte nun mittels Gelchromatographie in Q50 micro columns (Amersham Biosciences) aufgereinigt und so von freiem ³²P-dCTP befreit werden. Dazu wurde zunächst in den Säulchen enthaltener Puffer abzentrifugiert, dann der 25µl DNA-Ansatz nach Zugabe von weiteren 25µl STE-Puffer auf die Säule pipettiert und die markierte Sonde abzentrifugiert. Das Eluat wurde für 5min. auf 95°C erhitzt,

um die doppelsträngige Sonden-DNA aufzutrennen und bereit für die Hybridisierung zu machen.

2.6.6.7 Inkubation der Membran mit der DNA-Sonde

Die Blotmembran wurde zur Vorbereitung auf die Hybridisierung einmal mit 1M Tris-HCl, pH7,5 und darauf 5x mit MilliQ-H₂O gewaschen. Zur Präinkubation wurden 10ml QuickHyb (Firma) verwendet, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran und die Membran selbst abzusättigen. Hierfür lässt man die Membran für 1h bei 65°C in einer Glasröhre mit dem Hybridisierungspuffer drehen. Danach gibt man nun die radioaktiv markierte und denaturierte Sonde, und 100µl Heringssperma DNA die zuvor ebenfalls bei 95°C 5 Minuten erhitzt wurde. Der Ansatz wird in einem Hybridisierungssofen drehend ü.N. bei 60°C hybridisiert.

2.6.6.8 Waschen und Analysieren der Membran

Am nächsten Morgen wurde die Röhre aus 2.6.6.7 aufgestellt, so dass der Hybridisierungspuffer ablaufen konnte. Nach mehrmaligem Spülen mit 2xSSC wurde die Membran aus der Röhre entnommen und in eine Plastikwanne überführt. Nun wurde mindestens zweimal für 15min. bei 65°C mit 2xSSC gewaschen.

Anschließend wurde die Aktivität der Membran mit dem Geigerzähler kontrolliert. Im Bedarfsfall wurde die Membran solange weitergewaschen, bis die Aktivität bei 20 – 50 cpm liegt.

Wenn dies der Fall war, wurde die Membran bei Raumtemperatur auf Filterpapier getrocknet, in Klarsichtfolie eingeschweißt und für 1–3 Tage auf eine Phosphorimagerplatte aufgelegt. Anschließend wurde die Platte am Phosphorimager BAS-2500 (Fujifilm) ausgelesen und die entstandenen Signale mit Hilfe der PC-Programme BASReader und AIDA (Firma raytest) analysiert. Nach dem Ausdrucken des Blots konnte nun mit dem Lineal der Abstand zwischen DNA-Tasche und Signal gemessen werden. Der so bestimmte Abstand mit dem unter 2.6.6.3 beschriebenen Ausdruck verglichen und so die Größe der DNA-Banden bestimmt. Einfacher gestaltete sich diese Größenbestimmung bei unspezifischer Bindung der Sonde an den ebenfalls auf die Membran übertragenen DNA-Marker.

- | | | | |
|------------|-----------|------|----|
| - 20x SSC: | NaCl | 3000 | mM |
| | Na-Citrat | 300 | mM |
| | pH7.0 | | |

2.6.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen:

Der PCR-Ansatz oder Restriktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel in einem möglichst kleinen Volumen ausgeschnitten und das DNA-Fragment mit dem „NucleoSpin Extract II“-Kit (Macherey-Nagel) aus dem Gel eluiert und aufgereinigt.

Die Agarose wurde hierbei erst geschmolzen und die DNA dann an eine Anionenaustauschersäule gebunden, mehrfach gewaschen und anschließend die gereinigte DNA aus dem Säulenmaterial eluiert.

Aufreinigung von PCR-Produkten oder Spaltungsansätzen:

Um PCR- oder Spaltungsansätze von Reaktionsrückständen zu reinigen, wurde das „NucleoSpin Extract II“-Kit (Macherey-Nagel) laut Herstellerangaben verwendet.

2.6.8 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Eine Religation eines durch Restriktionsenzyme geschnittenen Vektors wurde durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase verhindert. Das Enzym spaltet die Phosphatgruppe an den 5'-Enden des Vektors ab. Nur der Einbau eines phosphorylierten 'Inserts' ermöglicht dann das Schließen des Vektors.

Enzym und Puffer: Alkalische Phosphatase (Boehringer)

10x Dephosphorylierungspuffer:	Tris-HCl	500	mM (pH 8,5)
	EDTA	1	mM

Reaktionsansatz:	Vektor-DNA	x	µg
	10x Dephosphorylierungspuffer	10	µl
	Alkalische Phosphatase	1	U
	H ₂ O	ad 100	µl

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde nochmals 1 U alkalischer Phosphatase zugegeben und nochmals wie oben inkubiert. Anschließend wird die dephosphorylierte DNA mit dem „NucleoSpin Extract II“-Kit aufgereinigt.

Ein Aliquot der DNA wurde mit Hilfe von Gelelektrophorese zur Mengenabschätzung aufgetrennt.

2.6.9 Ligation von DNA

Bei der Ligation wurde der dephosphorylierte Vektor mit einem DNA-Fragment durch eine T4-DNA-Ligase verbunden. Die Ligase katalysierte dabei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den benachbarten 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden. Der Vektor, sowie das zu inserierende DNA-Fragment wurden zunächst mit denselben oder kompatiblen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die 'Insert'-DNA wurde dann für die Ligation in einem von der Größe des Inserts abhängigem Überschuß gegenüber der Vektor-DNA zugegeben.

Ligationsansatz:	Vektor-DNA	10-100	ng
	'Insert'-DNA	3-5 x molarer Überschuß zur Vektor-DNA	
	10 x Ligase-Puffer (Boehringer)	1	µl
	T4-DNA-Ligase (Boehringer)	1	U
	H ₂ O	ad 10	µl

Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 4°C, anschließend wurde direkt in *E.coli* transformiert.

2.6.10 Transformation von *Escherichia coli*

Fremd-DNA wurde wie folgt in kompetente *E.coli*-Zellen eingebracht. Durch einen kurzen Hitzeschock wurde die Membran destabilisiert, so daß die DNA in das Zytoplasma gelangen konnte. Durch anschließende Kultur auf Selektivmediumplatten konnten nur Kolonien wachsen, die durch das transformierte Plasmid eine Antibiotikaresistenz erhalten hatten.

100 µl kompetenter *E. coli*-Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 50-200 ng Plasmid-DNA versetzt, vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 90 Sekunden bei 42°C inkubiert, was zur Aufnahme der Plasmid-DNA durch die Bakterien führte. Anschließend werden 220 µl SOC-Medium zugegeben und 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Im Falle einer Ampicillin-Resistenz auf dem Vektor entfiel dieser Schritt. Ampicillin behindert das Wachstum der Bakterien und hat keine abtötende Wirkung, so dass auch nach dem Ausplattieren Expression des Resistenzgens stattfand.

Nach der Inkubation wurden die transformierten Bakterien auf Agarplatten mit Selektivmedium ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

Die entstandenen Einzelkolonien wurden in 2 ml Medium kultiviert und die Plasmid-DNA zur Kontrolle präpariert.

2.6.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

2.6.11.1 Minipräparation

Zur Isolierung analytischer Plasmidmengen wurde die Plasmid-DNA über eine Fiberglassmatrix des „NucleoSpin Plasmid“-Kits (Macherey-Nagel) laut Herstellerangaben aufgereinigt.

2.6.11.2 Midi- und Maxipräparation

Für die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab wird die Plasmid-DNA nach Macherey-Nagel „NucleoBond PC100 bzw. PC500“-Kit Protokoll über eine Anionenaustauschersäule laut Herstelleranleitung aufgereinigt.

Die isolierte DNA wurde bei –20°C gelagert.

2.6.12 Photometrische Quantifizierung von DNA

DNA zeigt bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm ein Absorptionsmaximum. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde ein Aliquot der DNA-Lösung 1:200 mit Wasser verdünnt. Als Referenz wurde Wasser eingesetzt. Nach Messung der optischen Dichte konnte dabei die Konzentration der Lösung bestimmt werden. Eine OD_{260} von 0,1 entspricht einem Gehalt von 1 µg/ml an doppelsträngiger DNA.

Zur Berechnung gilt daher: $(OD_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 50) / 1000 = c_{\text{DNA}} \text{ µg/ml}$

Gerät: Gene Quant II (Amersham Pharmacia Biotech)

2.6.13 Mutagenese

Zur Herstellung von Nck2-Mutanten mit einem Defekt in je einer der 3 SH3-Domänen wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) ein Aminosäureaustausch durchgeführt. Dabei wurde in der jeweiligen SH3-Domäne das erste Tryptophan durch ein Lysin ersetzt. Das Prinzip der ‚Site-directed mutagenesis‘ besteht aus spezifischen Primern, die die entsprechende Mutation enthalten, einer PCR mit der *PfuTurbo*® DNA Polymerase und anschließendem Verdau der Ausgangs-DNA ohne Mutation mit der Endonuklease DpnI. DpnI erkennt dabei

spezifisch die durch *E.coli* methylierte Ausgangs-DNA, aber nicht die einen ‚nick‘ enthaltende DNA mit der gewünschten Mutation. Nach PCR und DpnI-Verdau wurde der Ansatz dann wie unter 2.5.10 beschrieben in *E.coli* transformiert. Die eingefügte Mutation wurde durch Sequenzierung überprüft. Im Fall der Doppelmutante W148/234K wurde die Mutante W148K als template verwendet und über eine weitere Reaktion die zweite Mutation eingefügt.

2.6.14 DNA-Sequenzierung

Die von Sanger entwickelte Methode zur enzymatischen Sequenzierung von DNA-Fragmenten basiert auf der Verwendung von Dideoxynukleotiden als Analoga zu den Deoxynukleotiden. Durch den zufälligen Einbau der Dideoxynukleotide mittels PCR kommt es zum Kettenabbruch der DNA-Synthese, da durch das Fehlen des notwendigen 3'-OH-Endes die Ausbildung der nächsten Phosphodiesterbindung verhindert wird.

Die vier verwendeten Dideoxynukleotide wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so daß die Fragmente bei Anregung mit einem Laserstrahl unterschiedliche Emissionsspektren aufwiesen und unterschieden werden konnten. Das entstandene DNA-Gemisch wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und per Laseranregung in einem computergestützten, automatischen Verfahren die Nukleotidsequenz der DNA ermittelt.

Gerät: T3 Thermocycler, Biometra

Puffer und Reagenzien :

DNA Sequencing Kit „Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“ mit dem „BigDye Premix“ (PE Applied Biosystems)

Reaktionsansatz:	DNA	0,5	µg
	Primer	1	µl
	BigDye Puffer 10x	1	µl
	BigDye	2	µl
	H ₂ O ad	10	µl

PCR-Programm:

- 1 Zyklus: 96°C, 5 min
- 25 Zyklen: 96°C, 15 s
- 50-55°C, 15 s
- 60°C, 4 min
- 1 Zyklus: 4°C, unbegrenzt

Die Analyse der fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente wurde von der Firma GATC Biotech AG in 'single-read' Genauigkeit übernommen. Zur Auswertung und Bearbeitung der Sequenzen wurde das Programm VectorNTI verwendet.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

verwendete Puffer und Lösungen :

Acrylamidlösung : 30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid

Es wurde die fertige Stammlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth) verwendet.

Sammelgel (5%): 1,1 ml H₂O
500 µl 0,5 M Tris-HCl, pH6,8
330 µl Acrylamidlösung
20 µl 10% (w/v) SDS-Lösung
4 µl TEMED
6 µl 25% (w/v) Ammoniumpersulfatlösung (APS)

Trenngel:	7,5%	10%	15%	
	3 ml	2,5 ml	1,4 ml	H ₂ O
	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	0,5 M Tris-HCl, pH6,8
	1,5 ml	2 ml	3 ml	Acrylamidlösung
	60 µl	60 µl	60 µl	10% SDS-Lösung
	8 µl	8 µl	8 µl	TEMED
	8 µl	8 µl	8 µl	25% APS

Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
4x Probenpuffer:	4 ml 10% (w/v) SDS-Lösung 2,3 ml H ₂ O 4 ml Glycerin 600 µl 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 400 µl 2-Mercaptoethanol 200 µl 5% (w/v) Bromphenolblau

Für die SDS-PAGE wurden Minigelapparaturen (Biometra) mit 1mm dicken 'Spacern' verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 4x Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C aufgeköcht.

Als Molekulargewichtsmarker dienten ein 10kD-Marker „PageRuler™ Protein Ladder“ (Fermentas) und ein vorgefärbter Marker „PageRuler™ PreStained Protein Ladder“ (ebenfalls Fermentas).

Für die Fokussierung im Sammelgel wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Zur Auftrennung der Proben im Trenngel wurde die Spannung auf 160 V erhöht.

Die in dem Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Coomassie gefärbt und analysiert oder für den Western Blot (s.u.) auf eine Kunststoffmembran transferiert.

2.7.2 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde ca. 30 min in der Färbelösung geschwenkt, anschließend kurz mit Wasser gespült und solange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich wurden.

Coomassie-Färbelösung:	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva) 25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 65% (v/v) H ₂ O
Coomassie-Entfärber:	10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Methanol 50% (v/v) H ₂ O

2.7.3 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Durch die Expression von Protein-Fragmenten als Fusionsproteine in *E. coli* können große Mengen eines Proteins in kurzer Zeit und mit geringem Aufwand produziert werden. Die Expressionsvektoren, die für die Konstruktion benutzt wurden, stellen alle notwendigen Sequenzen, wie Translationsstart- und Terminationssequenzen, für die Expression zur Verfügung und beinhalten induzierbare Promotoren, da eine Hyperexpression heterologer Proteine normalerweise mit dem Wachstum der Bakterien interferiert. Die Wachstumsphase der Bakterien kann von der Expressionsphase getrennt werden. Dies wird durch genau regulierte Promotoren (z.B. *lacZ*) in Kombination mit dem korrespondierenden Repressor (*lacI*) erreicht.

Die vom Vektor stammenden Polypeptide des Fusionsproteins führen wichtige Merkmale in das exprimierte Protein ein. Zum einen können labile Proteine stabilisiert werden, zum anderen werden Eigenschaften für eine Einschnitt-Reinigung eingefügt.

2.7.4 Konstruktion der Expressionsvektoren

Die Primer zur Amplifizierung des Genfragments (s. Kapitel 2.6.2) wurden so gewählt, daß sie an den 5'- und 3'-Enden jeweils für Restriktionsendonukleasen spezifische Sequenzen enthielten. Der gesamte PCR-Ansatz wurde wie in Kapitel 2.6.5 und 2.6.6 beschrieben im Agarosegel aufgetrennt, das entsprechende Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der Vektor pGEX-6P-1 mit den Restriktionsendonukleasen verdaut, der Vektor dephosphoryliert und beide Produkte aufgereinigt (s. Kapitel 2.6.6 bis 2.6.7). Das Genfragment wurde wie in Kapitel 2.6.8 beschrieben mit dem pGEX-6P-1 Vektor ligiert und zur Plasmidgewinnung in den *E.coli*-Stamm TG2 transformiert (s. Kapitel 2.6.9). Zur Kontrolle der Transformation wurden von einigen Kolonien Miniplasmidpräparationen durchgeführt (s. Kapitel 2.6.10) und die gereinigte Plasmid-DNA einer Restriktionsanalyse (s. Kapitel 2.6.4 und 2.6.5) unterzogen. Eine positive Kolonie wurde für die Maxiplasmidpräparation in eine Flüssigkultur gebracht und die Plasmid-DNA gemäß Kapitel 2.6.10 isoliert. Die DNA-Konzentration wurde darauf photometrisch bestimmt (s. Kapitel 2.6.11).

Nach Isolierung des Vektors aus einer Maxiplasmidpräparation wurden dann BL21 CodonPlus Bakterien transformiert. Bei BL21 handelt es sich um einen Protease-

defizienten Stamm, der besonders für die Expression klonierter Genprodukte, die während der Reinigung empfindlich gegenüber Hydrolyse sind, geeignet ist.

2.7.5 Expression von Fusionsproteinen

Die Proteinexpression des pGEX-6P-1-Plasmids steht unter der Kontrolle des lac-Promotors, der durch das Lactose-Analogon Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) induziert wird.

100 ml einer Übernachtskultur von BL21 CodonPlus-Bakterien, die mit dem pGEX Fusionsplasmid transformiert worden ist, wurden in 1 l LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin aufgenommen und bei 37°C und 180 rpm eine Stunde lang kultiviert. Dann wurden 0,1 mM IPTG (Endkonzentration) zur Induktion der Expression des GST-Fusionsproteins zugegeben. Der Ansatz wurde 4 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert (15 min, 6000 x g). Das Pellet wurde entweder bei -20°C eingefroren oder sofort in 8 ml kaltem PBS resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden mit Hilfe der French Pressure Cell Press (SLM-AMINCO Spectronic instruments) aufgeschlossen. Der Aufschluß erfolgte zweimal bei 1500 psi. Das Lysat wurde zentrifugiert (60 min bei 16000 x g, 4°C) und das Sediment bis auf eine geringe Probe verworfen. Es wurden ebenso Proben vor und nach der Induktion und aus dem Lysat-Überstand mittels SDS-PAGE (s. Kapitel 2.7.1) analysiert. Wenn das Fusionsprotein als lösliches Protein im Überstand exprimiert wurde, konnte es gereinigt und vom GST abgetrennt werden.

2.7.6 Reinigung der GST-Fusionsproteine

Fusionsproteine sind leicht durch Affinitätschromatographie mittels Glutathion Sepharose 4 B (Pharmacia Biotech) aus dem Bakterienlysate zu reinigen. Glutathion ist aufgrund von Epoxy-Aktivierung an Sepharose 4 B durch Kopplung an die Oxiran – Gruppe gebunden. Da die Struktur von Glutathion komplementär zur Bindungsstelle der Glutathion-S-Transferase (GST)-Bindungsstelle ist, können Fusionsproteine schon durch einen einzigen chromatographischen Schritt bis zu 90% gereinigt werden.

Das klare Lysat wurde nach Aufschluss und Zentrifugation direkt auf die Säule gegeben. Nach Bindung des Fusionsproteins an die Matrix, wurde diese gewaschen, um alle unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen.

Für 'pull down' Experimente verblieb das Fusionsprotein an der Sepharose. Diese wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Für

die Overlay wurde das Fusionsprotein mit 10mM reduziertem Glutathion (GSH, Sigma) in 50ml 50mM Tris-HCl, pH8,0 von der Säulenmatrix eluiert.

Für die Herstellung des polyklonalen Serums wurde das gereinigte Protein von der GST durch eine Sequenz-spezifischen Protease getrennt. Die PreScission-Protease (Amersham Pharmacia Biotech) erkennt die Sequenz Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro direkt vor der multiplen Klonierungssequenz (MCS) im pGEX –6P1– Plasmid und schneidet zwischen Gln und Gly-Resten.

Der Lysat-Überstand wurde mit Glutathion Sepharose 4 B unter Schütteln 1 h bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Säule mit PreScission Cleavage Buffer so lange gewaschen, bis keine OD₂₈₀ –Änderung mehr messbar war. Das Säulenmaterial wurde mit 100 µl (200 U) PreScission Protease versetzt. Der Verdau erfolgte 24 h bei 4°C unter Schütteln. Anschließend wurde das von GST getrennte Protein mit PBS eluiert.

PreScission Cleavage Buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 7,0)
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA

2.7.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur photometrischen Bestimmung der Protein-Konzentration wurde die Absorption einer Probe bei 280 nm gegen den Puffer, in welchem sich das Protein in Lösung befindet, gemessen. Die gemessene optische Dichte (OD) wurde mit dem Faktor 0,8 multipliziert, um die Proteinkonzentration zu erhalten:

$$OD_{280} = 1,0 = 0,8 \text{ mg/ml} = C_{\text{Protein}} \cdot$$

Die Genauigkeit dieser Methode ist für die durchgeführten Experimente ausreichend.

2.7.8 GST-Pulldown

2.7.8.1 Immobilisierung der GST-Fusionsproteine an Glutathion Sepharose

Die zuvor aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden aus der Dialyse genommen (s.Kapitel 2.7.6) und für eine Stunde mit 2/3 des für die Aufreinigung eingesetzten Volumens Glutathion Sepharose 4 B (GS; Amersham Pharmacia Biotech) bei 4°C und unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurde mit 300 ml PBS gewaschen. Die gewaschene Sepharose wurde dann im halben Volumen PBS mit 20% Glycerin resuspendiert und als 160 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Glycerin verhindert eine Schädigung der Proteine durch entstehende Eiskristalle. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.7.8.2 Aufschluss der transfizierten Zellen

Um die Zielproteine nach dem Pulldown mit einem α -GFP-Antikörper nachweisen zu können, wurden ausschließlich GFP-Fusionsproteine verwendet. Diese Fusionsproteine wurden nach Transfektion (s.Kapitel 2.8.3) in jeweils eine 10cm Kulturschale über Nacht exprimiert. Nach der Transfektion und Expression wurden die Zellen zweimal kurz mit PBS gespült. Anschließend wurde 1ml IP-Puffer, versetzt mit einer Minicomplete-Tablette pro 10ml, auf die Zellen gegeben und für 15min. inkubiert. Die somit bereits angelösten Zellen wurden mit einem cell-scraper (Nunc) abgeschabt, im IP-Puffer resuspendiert und in ein 1,5ml Eppendorf-Röhrchen gegeben. Nach Ultraschallbehandlung (10x 3 Sek.) wurden die Zelltrümmer bei 15000 x g und 4°C abzentrifugiert.

IP-Puffer: 8 mM Tris-HCl, pH 7,65

 12 mM Hepes

 50 mM NaCl

 10 mM KCl

 4 mM $MgCl_2$

 20 mM NaF

 2 mM ATP

 2 mM $NaVO_4$

 0,5% (v/v) Triton X-100

 0,5% (v/v) IGEPAL

 1 Tablette/10ml CompleteMini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)

2.7.8.3 GST-Pulldown

Mit einem GST-pulldown-assay ist es möglich, spezifisch an ein Köderprotein bindene Zielproteine aus einem Zellextrakt zu isolieren und somit die Interaktion mit dem Köderprotein nachzuweisen. Das Köderprotein wird hierzu über die Fusion mit GST an Glutathionsepharose gebunden und in ein kurz vorher genommenes Zelllysate gegeben. Während einer Inkubationszeit binden die Zielproteine an die immobilisierten Köderproteine. Durch abzentrifugieren der Sepharose können nun sowohl Köder-, als auch Zielproteine aus dem Zellextrakt isoliert und später nachgewiesen werden.

Je 20 µl der zu testenden Köderprotein-Sepharose-Suspension wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt. Von den Zelllysaten (s.Kapitel 2.7.8.2) wurden dann zunächst 50 µl als Referenz abgenommen und dann je 300 µl pro Transfektionsansatz auf die vorbereiteten Köderproteinbeads gegeben. Die Suspensionen wurden 45 min. bei 4°C geschüttelt und danach 3 min. bei 300 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgten 3 identische Waschschriffe mit jeweils 500 µl IP-Puffer. Dabei wurde nach Zugabe des IP-Puffers für 3 min. bei 300 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschriff wurde das Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein Gel aufgetragen (s.Kapitel 2.7.1) oder eingefroren.

2.7.9 Immunpräzipitation (IP)

Eine Immunpräzipitation funktioniert vom Prinzip her wie der oben beschriebene GST-Pulldown. Es wird hierbei allerdings kein GST-gekoppeltes, immobilisiertes Köderprotein genutzt, sondern ein Antikörper gegen ein bestimmtes Protein (endogen oder rekombinant überexprimiert). Der Antikörper wird in das Zelllysate gegeben, bindet das spezifische Antigen und wird dann mit an Sepharose immobilisiertem ProteinG präzipitiert. Protein G wurde ursprünglich in Bakterien der Gattung *Streptococcus* gefunden. Es bindet am konstanten Fc-Teil vieler Antikörper-Klassen. Auf diese Weise werden nun Antikörper, Antigen sowie am Antigen gebundene Proteine aus dem Zelllysate präzipitiert.

Das Zelllysate wurde gewonnen wie oben (2.7.8.2) beschrieben. Nach der Zentrifugation wurde zunächst eine Probe des Lysats genommen, der übrige Überstand dann für die IP mit 5 µg des entsprechenden Antikörpers versetzt und für 45 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20µl Protein-G-Sepharose (Amersham) zugesetzt und für weitere 45 min. rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-beads viermal mit IP-Puffer gewaschen (vgl. 2.7.8.3).

2.7.10 Western Blot

Der Western Blot erlaubt den spezifischen Nachweis von Proteinen. Das allgemeine Prinzip besteht darin, die durch SDS-PAGE entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine feste Matrix zu transferieren. Der Proteintransfer wird im 'semi-dry'-Verfahren mit einer PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Roth-PVDF, Roth) durchgeführt.

Die auf Gelgröße zugeschnittene Membran wurde vor dem Transfer eine halbe Minute lang in Methanol aktiviert. Anschließend wurden vier ebenfalls zugeschnittene Filterpapiere (Whatman) kurz in Blotpuffer getaucht. Das Gel und die Membran wurden nacheinander kurz in Blotpuffer äquilibriert. Die einzelnen Lagen wurden luftblasenfrei wie folgt auf die Kathode geschichtet:

2 Lagen Whatman-Papier
 SDS-Gel
 PVDF-Membran
 2 Lagen Whatman-Papier als direkter Abschluß zur Anode.

Der Transfer erfolgte für mindestens 1 Stunde bei 120 mA, bei mehreren Gelen (2 oder 3) pro Blotkammer mindestens 2 Stunden bei 150mA.

Nach dem Proteintransfer erfolgte der Nachweis des gesuchten Proteins mit spezifischen Antikörpern.

Blotpuffer:	50 mM	Tris-Base
	39 mM	Glycin
	0,037% (w/v)	SDS
	20% (v/v)	Methanol

2.7.11 Immunfärbung und Chemolumineszenz

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran (s.Kapitel 2.7.9) über Nacht bei 4°C oder 30min. bei Raumtemperatur (RT) mit 10% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T abgesättigt. Als Erst-Antikörper wurden Kulturüberstände von Hybridomzellen, Seren oder gereinigte Antikörper in den geeigneten Verdünnungen eingesetzt; die Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurden nach 2-maligem kurzen Spülen und 2- maligem Waschen für 5 min. mit TBS-T in geeigneten Verdünnungen eingesetzt. Es wurde 1 h bei RT auf einem Schwenktisch inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Membran gründlich je 10 min mit TBS-T, TBS-T + 0,5 M NaCl und TBS-T + 0,5% (v/v) Triton X-100 gewaschen und wieder in TBS-T überführt.

TBS-T:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	137 mM	NaCl
	0,1% (v/v)	Tween 20

Die Chemolumineszenz ist ein hochempfindliches Nachweisverfahren zur Detektion von immobilisierten Antigenen. Das Prinzip beruht auf der Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H_2O_2 durch die an Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Es wird dabei Licht freigesetzt, welches einen Röntgenfilm belichten kann.

Das chemolumineszente Substrat (Lumi-Light Blotting Substrate, Roche) wurde gemäß Herstellerangaben aus zwei Komponenten gemischt. Die gewaschene Membran wurde ca. 3 min bei RT mit der Substratlösung inkubiert.

2.7.11.1 Detektion der Chemolumineszenz mittels Röntgenfilm

Das Substrat wurde abgetropft und die Membran zwischen zwei Overhead-Projektor-Folien eingeschlagen. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms (Hyperfilm, Amersham Biosciences) auf der Membran ist von der Reaktionsstärke abhängig. Die Filme wurden in einer Entwicklermaschine (Curix 50, Agfa) entwickelt.

2.7.11.2 Detektion der Chemolumineszenz mittels CCD-Kamera

Die Membran wurde aus der Substratlösung genommen und mit der lumineszenten Seite nach oben in den Kameraschrank (Intelligent Dark Box, FujiFilm) gelegt. In dem entsprechenden Programm wurde eine Belichtungszeit von 2-10 min. eingestellt. Das entstandene Bild wurde an einem geeigneten Ort für die spätere Auswertung gespeichert.

Die Auswertung erfolgte mit Aida Image Analyzer Software (Raytest), wodurch die relative Signalstärke der erkennbaren Banden gegenüber dem Hintergrund ermittelt werden konnte.

2.7.12 Protein-Overlay Assay auf Objektträgern mit immobilisierten Peptiden

In Zusammenarbeit mit Ulrike Beutling aus der Arbeitsgruppe CBIO des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung wurde ein neues Verfahren für Protein-overlay assays entwickelt. Die Peptide werden dabei nicht auf Zellulose, sondern mit Hilfe eines DNA-Array Roboters (GMS417 Arrayer, Genetic Microsystems) auf Glasobjektträger (Menzel SuperFrost) gebracht, wobei in eine Reihe des Rasters GST als Positivkontrolle für den später verwendeten α -GST-Antikörper und in eine Reihe Biotin als generelle Orientierungshilfe aufgebracht worden ist. In der Arbeitsgruppe CBIO wurde dieses System bereits für Antikörper erfolgreich getestet.

Für die protein-overlay assays mit SH3-Domänen in dieser Arbeit musste das Protokoll stark angepasst werden.

Der mit Peptid beladene Objektträger wurde zunächst mit 70%igem Ethanol für 3min. gewaschen, um die Peptide besser für die wässrigen Lösungen zugänglich zu machen. Darauf wurde der Objektträger 3x für 3min. in TBS äquilibriert. Anschließend wurde mit 10% Milchpulver in TBS-T ü.N. bei 4°C abgesättigt. Am folgenden Tag wurden 90µl 1% Milchpulver in TBS-T mit 5µg/ml der gereinigten rekombinaten SH3-Domänen von Nck1, Nck2, IRSp53 oder Abi1 als GST-Fusionsproteine auf den Objektträger gegeben, der Bereich mit dem Peptidraster mit einem großen Deckgläschen bedeckt und der Aufbau in einer feuchten Kammer bei 4°C ü.N. inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Objektträger 3x 3min. mit TBS-T gewaschen und anschließend mit 1:500 α -GST Antikörper, gekoppelt an Cy5, sowie 1:500 Streptavidin, gekoppelt an Cy3, in 1% Milchpulver/TBS-T bedeckt. Als Schutz vor Verdunstung wurde der Objektträger mit einem großen Deckgläschen abgedeckt und ü.N. in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach rund 20h Inkubation wurde der Objektträger 3x für 5min. mit TBS-T gewaschen.

Die Detektion gebundener SH3-Domänen erfolgte über die Fluoreszenz von Cy3 und Cy5 in einem Micro-Array Lesegerät (Array Worx Auto-e, Applied Precision).

Die Quantifizierung und Evaluierung der Signalstärken fand mit Hilfe des Programms „Phoretix Array Advanced v1.0“(Nonlinear Dynamics Ltd.) statt.

2.7.13 Generierung polyklonaler Antikörper

Zur Immunisierung wurde die WA-Domäne von WAVE2 als GST-Fusionsprotein hergestellt. GST wurde nach Affinitätsaufreinigung über eine Glutathion-Sepharosesäule mit oben beschriebenem Protokoll abgetrennt und anschließend nochmals über FPLC aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden gepoolt und in einem 3kD-Ultrafiltrations-Röhrchen auf 1ml eingengt und die somit isolierte WAVE2-WA-Domäne zur Kaninchen-Immunisierung an BioGenes geschickt. Es wurden zwei 2-6 Monate alte Kaninchen (ZIKA) parallel immunisiert.

Aminosäuresequenz des zur Immunisierung verwendeten Poly-Peptids:

WAVE2-WA(*murin/human*)

C-FTGADGQPAIPPLSDTTKPKSSLPVSDARSDLLSAIRQGFQLRRVEEQREQEK
RDVVGNDVATILSRRIAVEYSDSEDDSSFEDEDDWSD-NH₂

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Standardkultur

Die Zellen wurden in sterilen Gewebekulturschalen (oberflächenbehandelte Corning für B16F1) mit den Durchmessern 10 cm bzw. 3 cm mit 10 ml bzw. 2 ml des jeweiligen Mediums kultiviert (s. Kapitel 2.5.1). Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (Nuaire US autoflow) bei 37°C in einer 7,5 %igen (v/v) CO₂-Atmosphäre.

2.8.2 Kultur auf Deckgläschen

Zur mikroskopischen Beobachtung wurden die Zellen ca. 24 h auf vorbehandelten Deckgläschen kultiviert. Zur Beseitigung von störenden Unreinheiten wurden die Deckgläschen in einer Lösung aus 60% Ethanol und 40% HCl 30 min gereinigt, mehrmals gründlich mit MilliQ-H₂O gewaschen und einzeln getrocknet. Die Sterilisation erfolgte für 4h bei 160°C.

2.8.3 Separation und Transfer

Nachdem adhärent wachsende Zellen eine bestimmte Konfluenz erreicht haben, werden sie enzymatisch oder mechanisch durch Lösen von Zell-Matrix-Verbindungen vom Boden der Kulturschale abgelöst, verdünnt und in einer neuen Kulturschale wieder ausgesät.

Die verwendeten Melanomzellen (B16F1) wurden zunächst mit vorgewärmtem PBS gewaschen und in Trypsin-EDTA-Lösung (TE; Gibco) solange inkubiert, bis sich die Mehrzahl der Zellen sichtbar abgerundet hat. Das Trypsin wurde nun durch Zugabe von mindestens 1 Volumen frischem Wachstumsmedium und dem darin enthaltenen FCS abgeblockt, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern. Anschließend wurden sie mit einer Pipette abgespült, vereinzelt, abzentrifugiert, in frischem, vorgewärmten Medium resuspendiert und in eine neue Kulturschale ausgesät.

TE: 0,5 g/ml Trypsin; 0,2 g/ml EDTA; in DMEM

2.8.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abtrypsinisiert, in Medium resuspendiert und abzentrifugiert (1000 rpm, 4 min). Das Zellpellet wurde in kaltem Kulturmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) resuspendiert und die Zellsuspension in

Kryoröhrchen aliquotiert (je 1 ml). Die Röhrchen wurden kurzfristig bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in Kryoröhrchen im 37°C -Wasserbad erwärmt, in kaltes DMEM überführt und abzentrifugiert (1000 rpm, 4 min). Das Zellpellet wurde in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und auf Gewebekulturschalen ausgesät.

2.8.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

Bei der Transfektion wird Plasmid-DNA oder generell Fremd-DNA in eine eukaryontische Zelle eingebracht. Mit einem geeigneten Transfektionsverfahren wird dabei die Plasmid-DNA durch die Zellmembran in das Zytoplasma geschleust. Ein Teil der transfizierten DNA kann dann in den Zellkern gelangen und dort transient exprimiert werden.

Die zu transfizierende DNA wurden durch Plasmidpräparation (s. Kapitel 2.6.10) aufgereinigt.

Es gibt mehrere Verfahren für die Übertragung von DNA durch Liposomen in tierische Zellen; in dieser Arbeit wird für Melanomzellen (B16F1) das SuperFectTM-Transfektionsreagenz (Quiagen), wie vom Hersteller empfohlen, verwendet. Die Effizienz wurde vorher mit FugeneTM-Transfektionsreagenz (Roche) verglichen. Für B16F1-Zellen eignen sich beide Reagenzien sehr gut, so dass das preiswertere SuperFectTM verwendet wurde. Für die Transfektion von NIH3T3- sowie #19-Zellen wurde Fugene verwendet, da die Transfektionseffizienzen hier wesentlich größer waren.

2.8.6 Verhungern und Stimulieren von Zellen

NIH3T3- bzw. Nck k.o.-Zellen (#13, #19 sowie stabil mit o.g. Nck2-Mutanten transfizierte #19)) wurden zur Untersuchung der Morphologie auf 12mm Deckgläschen, zu biochemischen Ansätzen in Immunpräzipitationen auf 10cm-Zellkulturschalen ausgesät. Auf die Deckgläschen wurden 7500 Zellen bzw. 15000 Zellen nach vorrangegangener Sortierung im Fall der transfizierten „#19“, auf 10cm-Schalen $1,5 \times 10^5$ bzw. 3×10^5 Zellen ausgesät. Nach 24h Inkubation bei Standard-Zellkulturbedingungen im jeweiligen Medium wurde das Medium abgesaugt, einmal mit DMEM 4,5 g/l Glucose ohne weitere Zusätze gewaschen und anschließend nochmal 24h mit DMEM 4,5 g/l Glucose ohne Zusätze verhungert. Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Phorboltester können die auf diese Weise verhungerten

Zellen stimuliert werden, um Morphologie und Biochemie der Zellen genauer zu untersuchen. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden für 5 min. mit 10ng/ml PDGF stimuliert, Zellen in 10cm Kulturschalen wurden für 15min. mit 10ng/ml PDGF stimuliert. Als Positivkontrolle in Immunpräzipitationen und bei Phosphorylierungsuntersuchungen wurde für 15-20min. mit 1µg/ml Tetradekanoylphorbol 13-Acetat (TPA, Sigma) stimuliert.

2.8.7 Herstellung von Zellextrakten

Die Zellen in einer konfluenten 10cm-Zellkulturschale wurden dreimal mit PBS gewaschen, dann durch Zugabe von 400 µl 4x Probenpuffer(s. Kapitel 2.7.1) lysiert und anschließend mit Hilfe eines cell scrapers (Nunc) von der Petrischale geschabt. Diese Suspension wurde 5 min bei 95°C aufgekocht und dann zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

2.8.8 Digitale Fluoreszenzmikroskopie

Die gesamte Immunfluoreszenz-Mikroskopie des Zytoskeletts der Zelle wurde im Prinzip, wie in (Herzog et al. 1994) und (Mies et al. 1998) beschrieben, durchgeführt. Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden spezielle Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) an Proteine oder andere Zellbestandteile gekoppelt. Durch Anregung dieser Farbstoffe mit einer definierten Wellenlänge emittieren sie Licht mit einer längeren Wellenlänge (vgl. Protein-overlay assay 2.7.12), beginnen also zu fluoreszieren. Dadurch ist es möglich, die räumliche und zeitliche Lokalisation der markierten Zellbestandteile in einer lebenden oder fixierten Zelle zu bestimmen. Das optische System eines Fluoreszenzmikroskops weist im Gegensatz zu einem normalen Mikroskop einige Besonderheiten auf. Es besteht aus zwei Sperrfiltern und einem dichroitischen Spiegel. Eine Quecksilberhochdruckdampfampe strahlt Licht auf den ersten Sperrfilter, dieser ermöglicht nur den Durchtritt von Licht einer bestimmten Wellenlänge, mit der verschiedene Fluorochrome angeregt werden sollen. Das Licht trifft auf den dichroitischen Spiegel, welcher das Licht reflektiert und durch das Objektiv auf die Probe leitet. Die Fluorochrome absorbieren das Licht und emittieren energieärmeres, also längerwelliges Licht. Das längerwellige Licht passiert den dichroitischen Spiegel und trifft anschließend auf einen zweiten Sperrfilter, welcher gestreutes Anregungslicht entfernt und das von den Fluorochromen emittierte Licht auf einen definierten Wellenlängenbereich eingrenzt. Das emittierte Licht wird danach entweder zum Okular geleitet oder zu einem mit einer CCD-

Kamera bestückten Mikroskopausgang geleitet. Die von der Kamera aufgenommenen Lichtinformationen werden durch einen A/D-Wandler in digitale Graustufenwerte umgesetzt und dann an einem Computer mit geeigneter Bildverarbeitungssoftware weiter verarbeitet.

Mikroskop

Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135TV (Carl Zeiss) mit wahlweise regelbarer 100W Quecksilberhochdruckdampflampe (AttoArc System, Carl Zeiss) oder Wolframlampe und manuell oder mittels Software kontrollierbarem Filterrad; durch Optovar-Linsen lässt sich die Gesamtvergrößerung um das 1,6 fache bzw. 2,5 fache erhöhen.

Objektive

Plan-Apochromat- und Plan-Neofluar-Immersionsölobjektive (Carl Zeiss):

100x 1,4 NA Plan-Apochromat

100x, 63x und 40x 1,3 NA Neofluar

Das verwendete Immersionsöl (Immersol 518F, Zeiss) hatte einen Brechungsfaktor von 1,518.

Beleuchtung

Regelung der Beleuchtung durch elektrisch aktivierbare Schnellverschlüsse (UniBlitz Model VMM-D1 Shutter-Driver, Vincent Associates); Shutter, manuell oder Software-gesteuert.

CCD-Kamera-System

Auf -30°C gekühlte Charged-Coupled-Device-Kamera (Photometrics „Cool Snap HQ²“, Visitron Systems) mit elektronisch aktivierter Kontrolleinheit und Verschluss.

Aufnahmekontrolle und Bildverarbeitung

Die Aufnahmekontrolle, Kontrolle der Schnellverschlüsse, die Kamerasteuerung und Bildverarbeitung erfolgt mit der Metamorph v.7.1.2 Software (Molecular Devices. Die weitere Bildverarbeitung für die Präsentation erfolgte mit Adobe Photoshop CS v.8.0 (Adobe).

2.8.8.1 Immunfluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen

Bei der indirekten Immunfluoreszenz fixierter Zellen erfolgt die Visualisierung der Proteine durch die Bindung eines primären Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wird. Durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einem primären Antikörper wird eine hohe Sensitivität erreicht, deren Prinzip auch in quantitativen Methoden genutzt wird (z.B. ELISA).

Um Aussagen über die Lokalisation der Proteine machen zu können, wurden diese zunächst mit 4% Paraformaldehyd in PBS, welches Proteinkomponenten miteinander vernetzt, für 20 min. fixiert. Damit die Antikörper in die Zellen und die entsprechenden Kompartimente gelangen können, wurden die Zellen mit einem Detergenz permeabilisiert. In dieser Arbeit wurde zur Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100 in PBS 1 min inkubiert.

Für die spezielle und detaillierte Untersuchung der Zellmorphologie der Nck1/2 flox/- und -/- Zelllinien wurde bei der 20-minütigen Fixierung 0,5% Glutaraldehyd zugesetzt. Um nach der Glutaraldehydfixierung freie, noch reaktive Gruppen abreagieren zu lassen, wurden die Präparate mit NaBH₄ behandelt (5 min auf Eis). Dies führt zu einer deutlichen Reduktion unspezifischer Fluoreszenz. Anschließend wurde vor Inkubation mit Phalloidin zur Anfärbung von F-Aktin (s.u.) viermal mit PBS gewaschen.

2.8.8.2 Antikörper-Hybridisierung

Die fixierten und permeabilisierten Zellen auf Deckgläschen wurden 45 min mit einem Pferdeserum-haltigen Blocking-Puffer (5% Pferdeserum in 1% BSA in PBS) inkubiert. Anschließend wurden 40 µl Blocking-Puffer (1% BSA in PBS) mit entsprechend verdünntem primären Antikörper (s. 2.8.10) auf einen Streifen Parafilm getropft, das Deckgläschen umgekehrt auf diesen Tropfen gelegt und 45 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Es folgte die Hybridisierung mit dem Sekundärantikörper (s. Kapitel 2.8.2) analog zum primärem Antikörper für 45 min und dreimaliges Waschen mit PBS. Die Deckgläschen wurden umgekehrt auf einem Tropfen „Prolong Gold antifade reagent“ (Invitrogen) auf einen Objektträger fixiert und ü.N. bei RT getrocknet und bis zur Auswertung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Zur Betrachtung wurden die Proben in eine Objektträger-Halterung am Mikroskop eingespannt, Einzelbildaufnahmen wurden wie unter 2.10 beschrieben durchgeführt.

Die in der Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper sind unter Kapitel 2.8.1 und 2.8.2 aufgelistet.

2.8.8.3 Phalloidin

Phalloidine sind Toxine des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*. Sie lagern sich seitlich an die Aktinfilamente an und blockieren dadurch die Depolymerisation (Cooper, 1987). Durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an Phalloidin gekoppelt werden, können Aktinfilamente für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde Phalloidin gekoppelt an Alexa Fluor™ 594 (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:400 in Blocking-Puffer (1% BSA in PBS) eingesetzt.

2.8.9 Gene-targeting in embryonalen Stammzellen

2.8.9.1 Vorbereitung des targeting-Konstrukts auf die Elektroporation

Das hergestellte Konstrukt (hier aus pBluescript) wurde wie in 2.6.11.2 beschrieben in einer Midi-Präparation aus *E.coli* aufgereinigt. Zur Linearisierung des Konstrukts wurde XhoI verwendet und der Verdau wie folgt angesetzt:

Plasmid-Linearisierung:	150 µg DNA
	15 µl XhoI 20U/µl (NEB)
	30 µl Restriktionspuffer 2 (NEB)
	130 µl H ₂ O

Ausgehend von der Aktivität des Restriktionsenzym von 1µg DNA/h pro unit wurde das Doppelte der benötigten Menge XhoI eingesetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator, um eine vollständige Linearisierung zu gewährleisten. Anschließend wurde 1µl der verdauten DNA in einem 1% Agarosegel auf eine vollständige Spaltung hin überprüft (vgl.2.6.5)

Zur Aufreinigung des erhaltenen linearisierten Plasmids wurde die im Restriktionsansatz erhaltene DNA nach Zugabe von 200mM NaCl sowie dem doppelten Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation und Trocknung des Präzipitats wurde es bei -20°C gelagert.

2.8.9.2 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 2 Platten ES-Zellen auf Feederzellen (siehe 2.5.2) vorbereitet. 2 Stunden vor der Elektroporation wurde das Medium noch einmal gewechselt. Die ES-Zellen wurden 10min. bei 37°C trypsiniert, zentrifugiert und

anschließend mit 10ml vorgekühltem PBS auf Eis resuspendiert. Es wurden 10^8 Zellen pro Elektroporationsküvette eingesetzt. Die entsprechende Menge an Zellen wurde also nochmals abzentrifugiert und in 600 μ l kaltem PBS resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden sofort in das Röhrchen mit der vorbereiteten DNA gegeben und dort für 5-10min. bis zur Lösung des DNA-Pellets auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde nun direkt in eine Elektroporationsküvette gegeben und bei 240V und 500 μ F elektroporiert. Nach 20-30min. auf Eis wird die Zellsuspension in 10ml ES-Zellmedium aufgenommen und auf 10 vorbereitete Platten mit Feederzellen verteilt. Am folgenden Tag wurde das Medium erneut gewechselt.

2.8.9.3 Selektion

48h nach der Elektroporation wurde dem Medium 400 μ g/ml G418 zugesetzt und alle 2 Tage, bei starkem Zelltod auch täglich, das Medium gewechselt. 8-9 Tage nach der Elektroporation konnten Klone gepickt werden.

2.8.9.4 „Klone picken“

Dazu wurden 9 96-well Platten mit Feederzellen vorbereitet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass 1 96-well Platte einer 10cm Schale entspricht. Ausserdem wurden 3 weitere 96-well Platten mit 50 μ l Trypsin/EDTA (vgl.2.8.3) vorbereitet. Mit einer 20 μ l Pipette (Gilson) wurden einzelne Klone aus den 10cm Schalen mit den elektroporierten und G418 selektierten Zellen gepickt und jeder Klon in jeweils eine der vorbereiteten, trypsinhaltigen Vertiefungen gegeben. Nach Beladen von 2 Reihen der Platte mit Klonen, wurde sie für 5min. in den CO₂ Inkubator bei 37°C gestellt und das Trypsin durch Zugabe von 100 μ l ES-Medium abgeblockt. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren mit der 12-Kanalpipette wurden eventuell zusammenhängende Zellaggregate gelöst und je 50 μ l der Zellsuspension in 3 der vorbereiteten 96-well Feederzell-Platten gegeben. Hierbei wurde jede Reihe der Trypsinierungsplatte nur einmal genutzt und in die entsprechenden Vertiefungen der Feederzellplatten überführt. Ab hier wurde das Medium in den Platten täglich gewechselt, bis die Einzelklone in allen Vertiefungen der 96-well Platten ausgebreitet waren. Jeder Klon lag nun in 3 Platten vor, von denen jeweils 2 nach 2.8.4 eingefroren worden sind und eine für den Southern Blot (2.6.6) vorbereitet wurde.

2.8.10 Verwendete Konstrukte

Tab.2.1: Liste der verwendeten DNA-Konstrukte

Konstrukt	Vektor	Spezies	Herkunft/Referenz
GFP-Abi1 PP	pEGFP	Mensch	Diese Arbeit
GFP-Eps8	pEGFP	Maus	G. Scita (Scita et al., 2001)
GFP-IRSp53	pEGFP	Mensch	T. Takenawa (Nakagawa et al., 2003)
GFP-IRTKS	pEGFP	Maus	J. Ehinger (Diss. 2006)
GFP-Mena	pEGFP	Mensch	J. Wehland (Bear et al., 2000)
GFP-Nck1	pCB6-GFP	Mensch	M. Way (Frischknecht et al., 1999)
GFP-Nck2	pCB6-GFP	Mensch	M. Way (Scaplehorn et al., 2002)
GFP-Nck2W148/234K	pCB6-GFP	Mensch	Diese Arbeit
GFP-Nck2W148K	pCB6-GFP	Mensch	Diese Arbeit
GFP-Nck2W234K	pCB6-GFP	Mensch	Diese Arbeit
GFP-Nck2W38K	pCB6-GFP	Mensch	Diese Arbeit
GFP-N-WASP	pEGFP	Maus	S. Lommel (Lommel et al., 2001)
GFP-VASP	pEGFP	Mensch	J. Wehland (Carl et al., 1999)
GFP-WAVE1	pEGFP	Maus	J. Ehinger (Diss. 2006)
GFP-WAVE2	pEGFP	Maus	J. Ehinger (Diss. 2006)
GFP-WAVE2 PP	pEGFP	Mensch	P.Hagendorff
GFP-WAVE3	pEGFP	Maus	J. Ehinger (Diss. 2006)
GST-Abi1 PP	pGEX-6P-1	Mensch	Diese Arbeit
GST-Abi1 SH3	pGEX-6P-1	Mensch	P.Hagendorff
GST-Eps8 SH3	pGEX-6P-1	Maus	G. Scita (Kishan et al., 1997)
GST-EVL EVH1	pGEX-6P-1	Mensch	J. Wehland (Carl et al., 1999)
GST-EVL(AA1-117)	pGEX-6P-1	Mensch	Diese Arbeit
GST-IRSp53 SH3	pGEX-6P-1	Mensch	J. Ehinger (Diss. 2006)
GST-Mena EVH1	pGEX-6P-1	Mensch	J. Wehland (Carl et al., 1999)
GST-Nck1 SH3#1	pGEX-6P-1	Mensch	A. Fabian (Diss. 2005)
GST-Nck1 SH3#2	pGEX-6P-1	Mensch	A. Fabian (Diss. 2005)
GST-Nck1 SH3#3	pGEX-6P-1	Mensch	A. Fabian (Diss. 2005)
GST-Nck2	pGEX-6P-1	Mensch	Diese Arbeit
GST-Nck2 SH3#1	pGEX-6P-1	Mensch	A. Fabian (Diss. 2005)
GST-Nck2 SH3#2	pGEX-6P-1	Mensch	A. Fabian (Diss. 2005)
GST-Nck2 SH3#3	pGEX-6P-1	Mensch	A. Fabian (Diss. 2005)
GST-N-WASP PP	pGEX-6P-1	Maus	P.Hagendorff
GST-VASP EVH1	pGEX-6P-1	Mensch	J. Wehland (Carl et al., 1999)
GST-VASP(AA1-116)	pGEX-6P-1	Mensch	Diese Arbeit
GST-WAVE1 PP	pGEX-6P-1	Mensch	P.Hagendorff
GST-WAVE2 PP	pGEX-6P-1	Mensch	P.Hagendorff
pIRES-GFP Nck2	pIRES	Mensch	Diese Arbeit
pIRES-GFP Nck2W148/234K	pIRES	Mensch	Diese Arbeit
pIRES-GFP Nck2W148K	pIRES	Mensch	Diese Arbeit
pIRES-GFP Nck2W234K	pIRES	Mensch	Diese Arbeit
pIRES-GFP Nck2W38K	pIRES	Mensch	Diese Arbeit
YFP-Abi1	pEYFP	Mensch	A.M. Pendergast (Courtney et al., 2000)

2.8.11 Verwendete Antikörper

Tab.2.1: Liste der verwendeten Antikörper und Markierungsreagenzien

Bezeichnung	Herstellung/Firma	Art/Herkunft	Verwendung*	gekoppelt mit...
α GFP 101G4B2	Synaptic Systems (HZI)	monoklonal/Maus	WB	-
α GFP 27F5	Synaptic Systems (HZI)	monoklonal/Maus	IP	-
α GFP H5-8	Eurogentec (HZI)	polyklonal/Kaninchen	WB	-
α GST	GE Healthcare	monoklonal/Maus	PA	Peroxidase
α GST	GE Healthcare	monoklonal/Maus	PA	Cy5
α Kaninchen-IgG/IgM	Dianova	polyklonal/Ziege	WB (2.AK)	Peroxidase
α Maus-IgG	Dianova	polyklonal/Kaninchen	WB (2.AK)	Peroxidase
α Nap1 #4952	Biogenes	polyklonal/Kaninchen	WB	-
α Nck	Transduction Laboratories	monoklonal/Maus	WB	-
α Nck 51C11	Synaptic Systems (HZI)	monoklonal/Maus	IP	-
α Nck 51F4	Synaptic Systems (HZI)	monoklonal/Maus	IP	-
α N-WASP 32A2	Synaptic Systems (HZI)	monoklonal/Maus	WB, IP	-
α WAVE	Giorgio Scita, IEO Mailand	polyklonal/Kaninchen	IP	-
α WAVE #1735	Biogenes	polyklonal/Kaninchen	WB	-
α WAVE #1736	Biogenes	polyklonal/Kaninchen	WB	-
α WAVE #5502	Biogenes	polyklonal/Kaninchen	WB	-
Extravidin	Sigma	-	PA	Peroxidase
Phalloidin	Invitrogen	-	IF	Alexa Fluor TM 594
Streptavidin	Dianova	-	PA	Cy3

*: Verwendungen: IP = Immunpräzipitation, IF = Immunfluoreszenz, WB = Western Blot, PA = Peptide Array

3 Ergebnisse

3.1 Ena/VASP Proteine

Ergänzend zu den schon vorhandenen Daten zum Bindungsverhalten von SH3-Domänen-Proteinen an WASP/Scar Proteine sowie untereinander, soll diese Methode nun auf die EVH1-Domänen der Ena/VASP Proteine ausgeweitet werden. Da auch Ena/VASP-Proteine prominente Prolin-reiche Sequenzen haben, wurde zudem eine Interaktionskarte für die schon vorher behandelten SH3-Domänen-Proteine erstellt. Dazu wurden GST-Pulldowns durchgeführt, bei denen überexprimierte GFP-Fusionen der Ena/VASP-Proteine mit SH3-Domänen von den Adapterproteinen Abi1, Eps8, IRSp53 sowie Nck1 und Nck2 präzipitiert werden sollten, die für die WASP/Scar-Signalgebung relevant sind. Außerdem wurde versucht in GST-Pulldowns mit GST-gekoppelten EVH1-Domänen der Ena/VASP-Proteine diese Adapterproteine sowie die WASP/Scar-Proteine selbst anzureichern. Auf diese Weise lassen sich die relativen Bindungsstärken der eingesetzten Domänen zu den jeweiligen Zielproteinen *in vitro* einschätzen.

3.1.1 Expression und Aufreinigung der GST-EVH1-Domänen

In Vorbereitung auf die GST-Pulldowns mit isolierten EVH1-Domänen wurden zunächst die EVH1-Domänen aus vorhandenen pGEX-6P-1 Vektoren die EVH1-Domänen von VASP (AA1-149), Mena (AA1-116) und EVL (AA1-153) nach 2.7.5-2.7.7 hergestellt und an Glutathion-Sepharose-beads (Amersham BioSciences) gekoppelt (siehe 2.7.8.1). In Abbildung 3.1 ist das Kontrollgel der Aufreinigung dargestellt. Um eine besser vergleichbare Domänenlänge in den Versuchen verwenden zu können, wurden die Konstrukte von VASP und EVL über PCR entsprechend verkürzt. Die EVH1-Domäne von VASP wurde als VASP(AA1-116), die von EVL als EVL(AA1-117) kloniert und expriert.

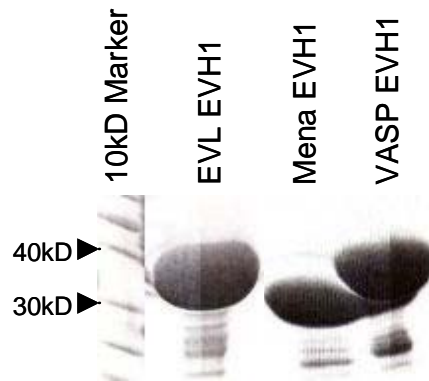


Abb.3.1: Immobilisierte EVH1-Domänen nach Aufreinigung

Aufgetragen sind 5µl Sepharose-Suspension auf 15% Agarosegel, anschließend gefärbt mit Coomassie-Färbelsg. Das Gel zeigt Aufreinigungen der ursprünglich vorhandenen Konstrukte EVL(AA1-153), Mena(AA1-116) und VASP(AA1-149).

3.1.2 GST-Pulldowns mit isolierten GST-EVH1-Domänen

Es wurden GFP-Konstrukte (pEGFP, im Fall der Ncks pCB6-GFP) von Abi1, Eps8, IRSp53, Nck1, Nck2, N-WASP sowie WAVE1-3 in B16F1-Zellen transfiziert und deren Expression anhand der Fluoreszenz des GFP kontrolliert. Alle Konstrukte waren effizient transfiziert. Aus diesen Zellen wurde mit den in 3.1.1 hergestellten immobilisierten EVH1-Domänen GST-Pulldowns durchgeführt, die in Western Blots (vgl.2.7.10) ausgewertet wurden (Abb.3.2).

Die Auswertung erfolgte über visuelle Einschätzung der Signalintensität im Western Blot (WB). Sehr starke Signale wurden mit 1,0 bewertet, starke Signale mit 0,75, mittlere mit 0,5, schwache Signale mit 0,25, und die Abwesenheit eines Signals mit 0,0. In Diagramm 3.1 sind die Ergebnisse der mindestens dreimal wiederholten Versuche zusammengefasst.

Alle drei EVH1-Domänen zeigen starke Affinität zu Abi1. Die relativen Stärken der Interaktionen mit anderen untersuchten Proteinen unterscheiden sich voneinander. Während die EVH1-Domäne von Mena ebenfalls auffällige Interaktionen mit WAVES und WASP/N-WASP zeigt, sind diese bei EVL schwächer und fehlen bei der EVH1-Domäne von VASP beinahe ganz (Abb.3.2). VASP und Mena zeigen hier zudem schwächere Interaktionen mit IRSp53. Das auf die reine EVH1-Domäne verkürzte VASP(AA1-116) zeigte bis auf eine zusätzliche schwache Interaktion mit WAVE1 ein identisches Bindungsverhalten zu dem vorher verwendeten VASP(AA1-149) (Abb.3.3). Das verkürzte Konstrukt EVL(AA1-117) war nicht funktionstüchtig und zeigte in GST-Pulldown-Versuchen keinerlei Interaktion.

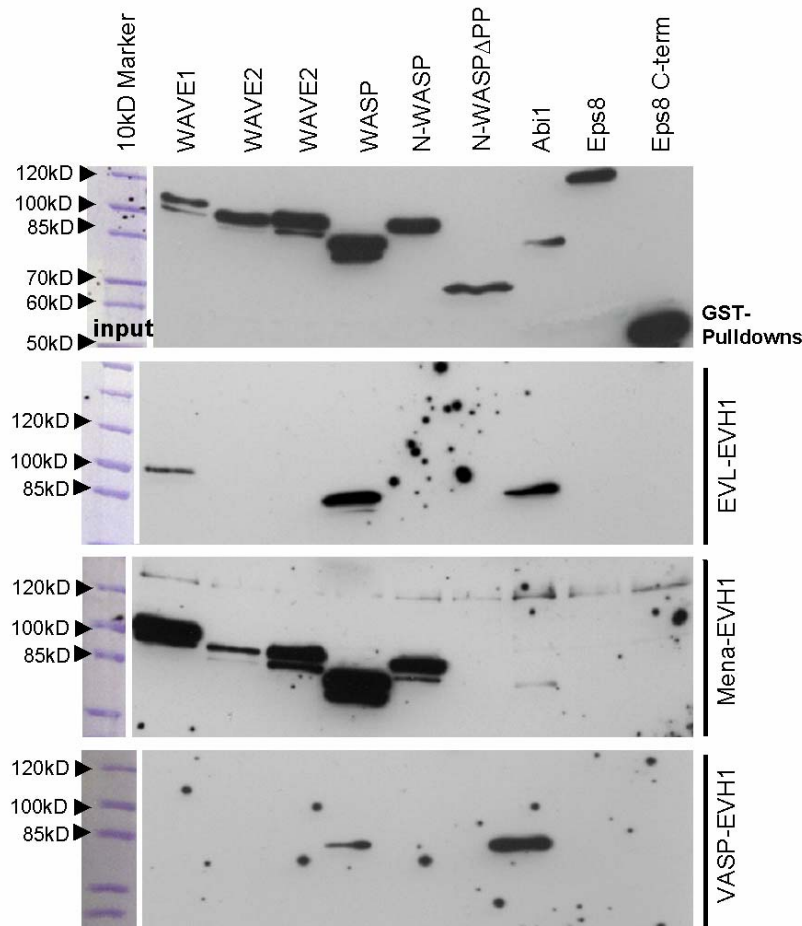


Abb.3.2: GST-Pulldowns von GFP-Fusionsproteinen mit isolierten EVH1-Domänen (WB: α GFP, 101G4B2)

Abgebildet sind entwickelte Immunblots der Pulldown-Proben (je 10 μ l). Die im jeweiligen Versuch überexprimierten Zielproteine sind über den Blots notiert und in der gesamten Abbildungen mit einem monoklonalen α GFP-Antikörper nachgewiesen.

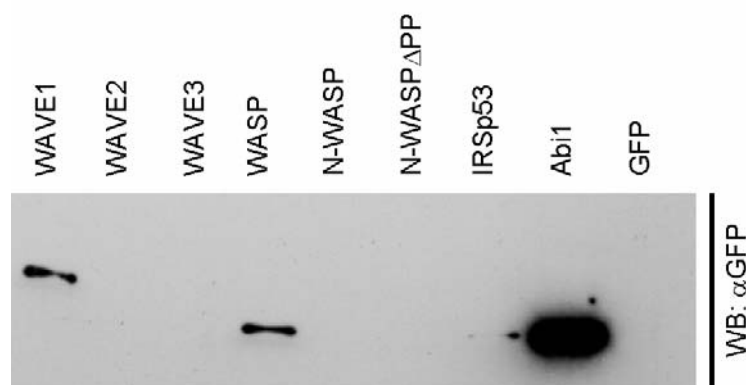


Abb.3.3: GST-Pulldowns mit VASP(AA1-116)

Abgebildet sind wie oben entwickelte Immunblots der Pulldown-Proben (je 10 μ l). Für die GST-Pulldowns wurde hier das GST-fusionierte VASP-Konstrukt VASP(AA1-116) verwendet. Ansonsten wie Abb.3.2.

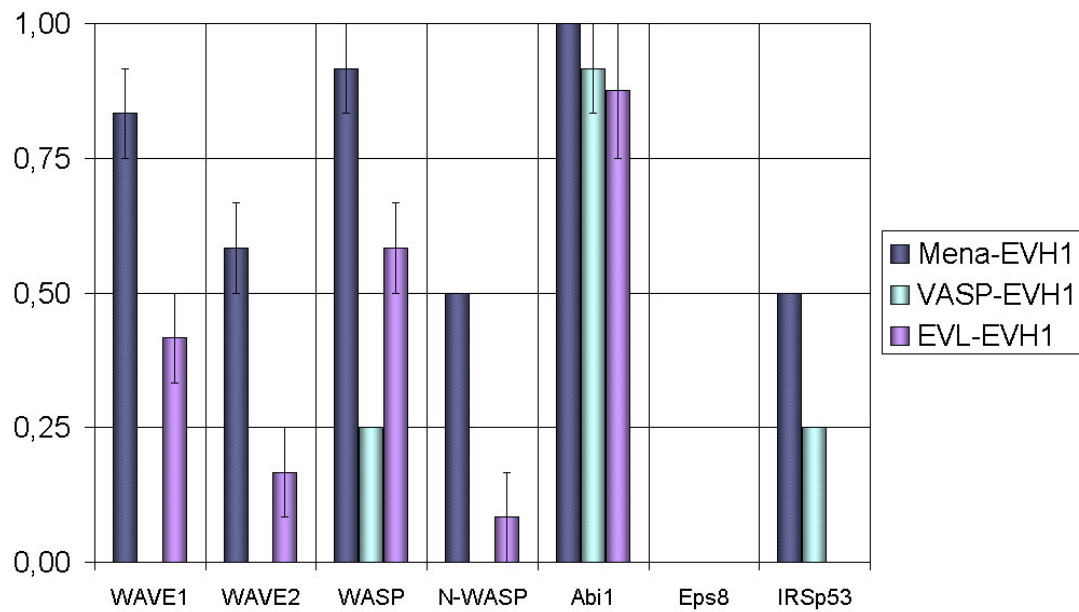


Diagramm 3.1: Mittlere gemessene Interaktionsstärken der EVH1-Domänen

Das Diagramm zeigt die mittleren gemessenen Interaktionsstärken der EVH1-Domänen von Mena, VASP und EVL zu den jeweils angegebenen Zielproteinen. Die Interaktionsstärken reichen hierbei gemäß der Einteilung von 0 (keine im WB sichtbare Interaktion) bis 1 (maximale Interaktion). Angegeben sind außerdem die aus der Experimentzusammenfassung entstandenen Standardfehler.

3.1.3 GST-Pulldowns von Ena/VASP-Proteinen mit isolierten SH3- Domänen

Bei den GST-Pulldowns mit isolierten SH3-Domänen von Abi1, Eps8, IRSp53, Nck1 und Nck2 wurden die vorhandenen GFP-Konstrukte von Mena und VASP in B16F1-Zellen überexprimiert. Beide Konstrukte zeigten gute Transfektionsraten und demzufolge eine deutliche Fluoreszenz des GFP. Die Pulldowns wurden wie in 2.7.8 durchgeführt und im Western Blot wie oben mit GFP-Antikörper (101G4B2) ausgewertet (Abb.3.4).

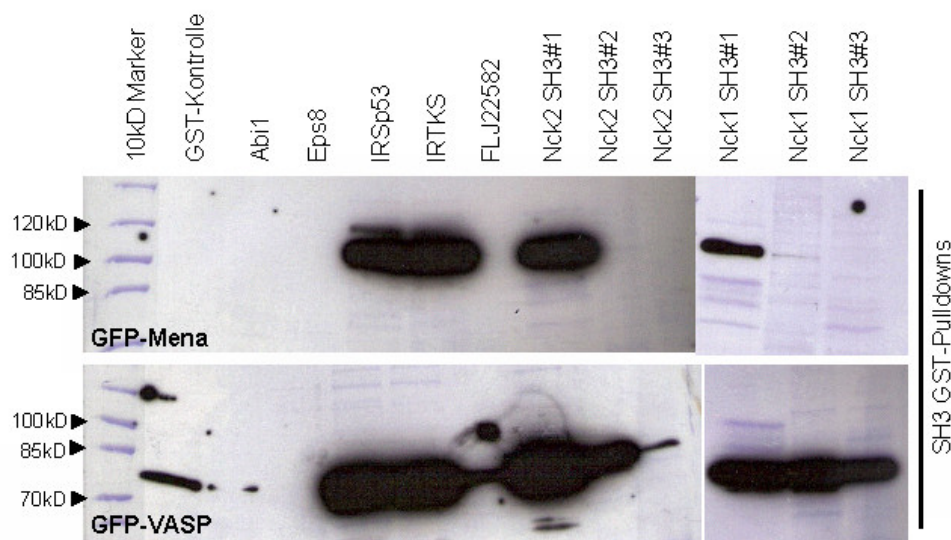


Abb.3.4: GST-Pulldowns von Ena/VASP-Proteinen mit isolierten SH3-Domänen (WB: α GFP, 101G4B2)

Abgebildet sind entwickelte Immunblots der Pulldown-Proben (je 10 μ l). Die Antikörper-Signale sind hier mit der Coomassie-gefärbten PVDF-Membran in blau unterlegt. Die im jeweiligen Versuch eingesetzte SH3-Domäne ist über den Blots-overlays notiert. Im oberen Blot ist angereichertes GFP-Mena, im unteren angereichertes GFP-VASP durch den verwendeten α -GFP-Antikörper (101G4B2) zu sehen.

Die Zusammenfassung aller Werte nach dem in 3.1.2 genannten System findet sich in Diagramm 3.2. Die stärksten Interaktionen von sowohl GFP-Mena als auch GFP-VASP sind mit der SH3-Domäne von IRSp53 und der ersten SH3-Domäne von Nck2 zu beobachten. Mittlere bis starke Interaktionen zeigen beide Moleküle auch mit der ersten SH3-Domäne von Nck1. Mena lässt sich fast ausschließlich mit diesen Domänen und mit mittlerer Intensität mit Nck1#1 anreichern. Mit den übrigen Domänen zeigt Mena nur schwache (Nck1#2, Nck2#2) bis gar keine Signale. VASP hingegen zeigt auch mit allen anderen SH3-Domänen und sogar mit GST mittlere bis schwache Interaktionen. Lediglich bei der SH3-Domäne von Eps8 gibt es kein Signal.

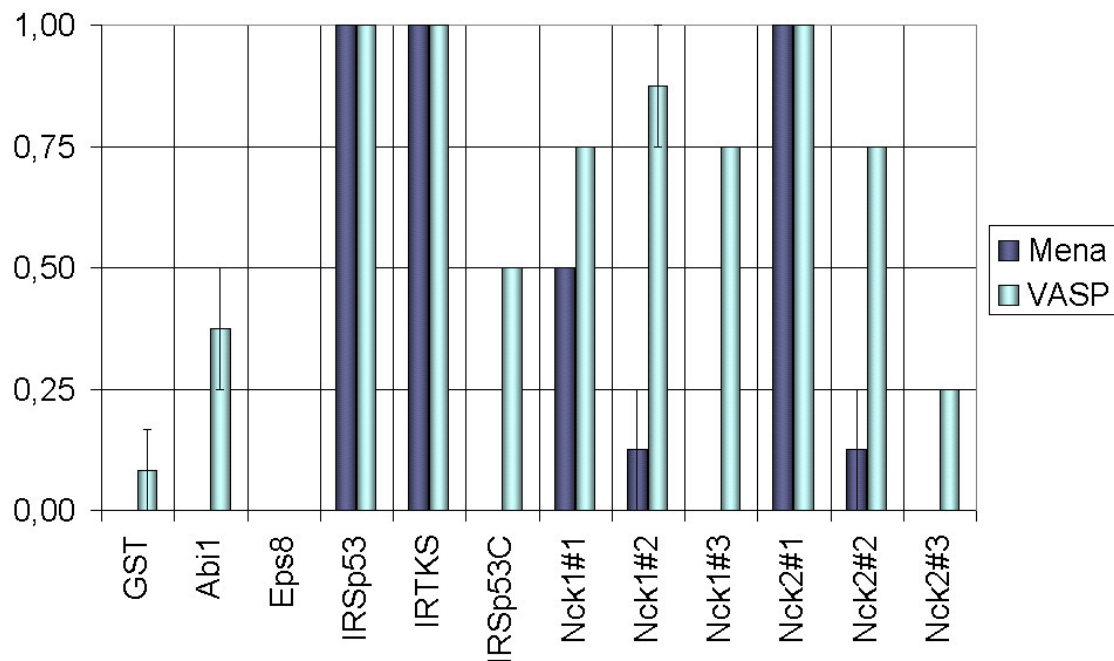


Diagramm 3.2: Interaktionsstärken von Mena bzw. VASP mit verschiedenen SH3-Domänen

Das Balkendiagramm zeigt die mittleren gemessenen Interaktionsstärken von überexprimiertem Mena bzw. VASP mit immobilisierten SH3-Domänen der unten angegebenen Proteine sowie GST als Kontrolle. Die Interaktionsstärken reichen hierbei gemäß der zuvor erläuterten Einteilung von 0 (keine im WB sichtbare Interaktion) bis 1 (maximale Interaktion). Angegeben sind außerdem die aus der Experimentzusammenfassung entstandenen Standardfehler.

Mit den Daten der Diplomarbeit (Abb.3.5) lassen sich diese Ergebnisse in einer Grafik (Abb.3.6) schematisch zusammenfassen.

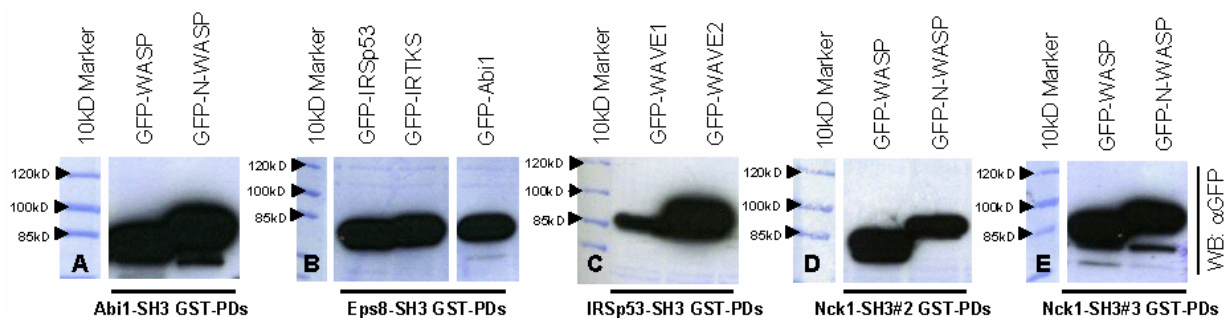


Abb.3.5: Ergebnisse der Pull-down-Experimente der Diplomarbeit (WB: α GFP, 101G4B2)

Die Abbildungen zeigen einige Western Blots mit Proben aus GST-Pulldowns der Diplomarbeit. Es wurden GST-Pulldowns mit SH3-Domänen von Abi1, Eps8, IRSp53 sowie Nck mit B16-Zellen durchgeführt, die verschiedene WASP/Scar- sowie an deren Signalgebung beteiligte Proteine als GFP-Konstrukt exprimierten. Der GFP-Antikörper zeigt die angereicherten Proteine im Blot. Die Coomassie-gefärbte Membran (in blau) ist mit den Blots überlagert worden.

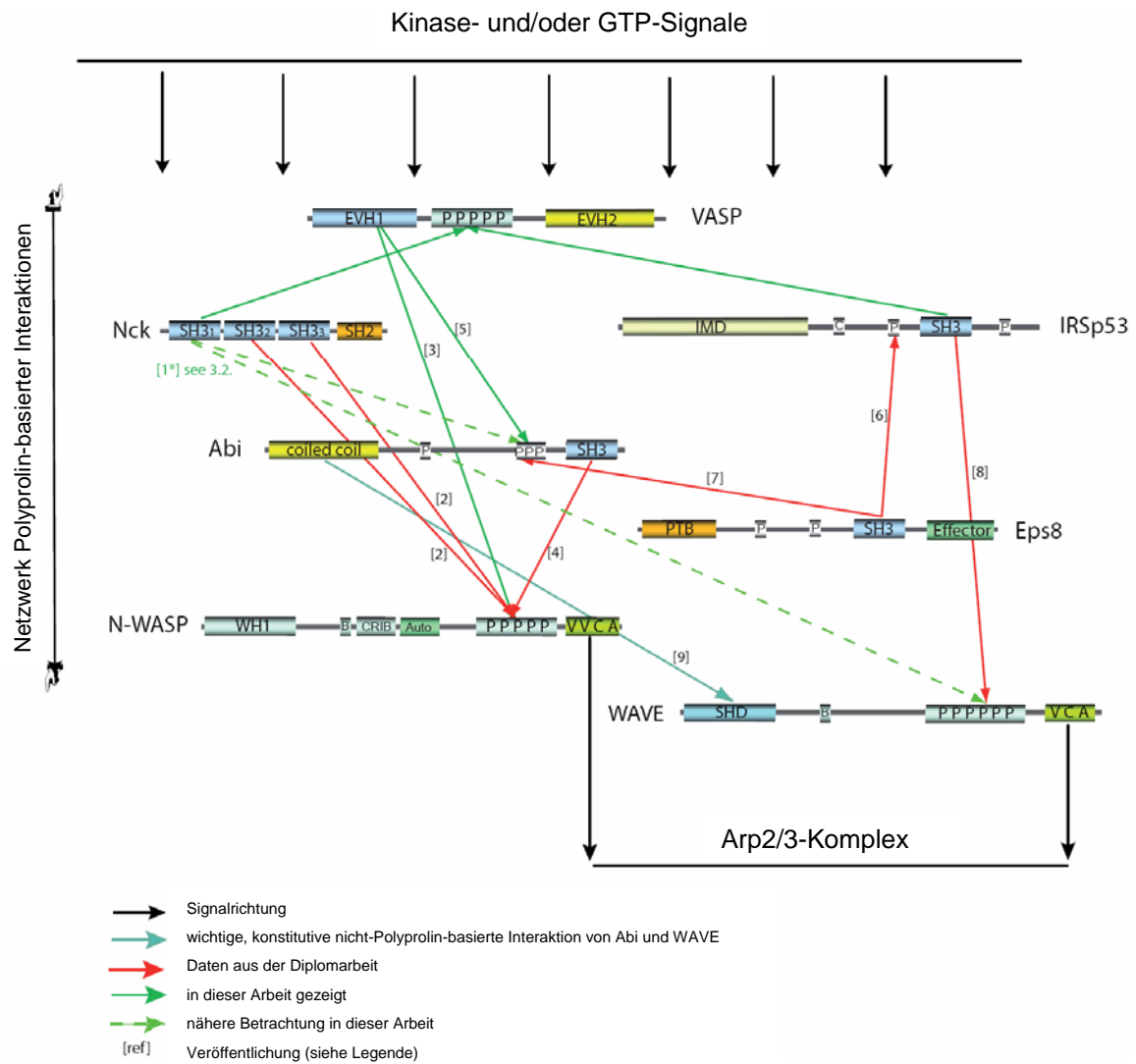


Abb.3.6: Netzwerk Polyprolin-basierter Interaktionen

Die Abbildung zeigt eine schematische Zusammenfassung der in dieser Arbeit und der vorangegangenen Diplomarbeit betrachteten Interaktionen und deren Verhältnis zu Kinase- bzw. GTP-Signalgebung auf der einen und dem Arp2/3 Komplex auf der anderen Seite. Die entsprechenden Veröffentlichungen sind neben den Pfeilen notiert. ([1] Kitamura et al., 1996; [2] Rohatgi et al., 2001; [3] Castellano et al., 2001; [4] Innocenti et al., 2004; [5] Tani et al., 2003; [6] Disanza et al., 2006; [7] Mongioli et al., 1999; [8] Miki et al., 2000; [9] Innocenti et al., 2004)

3.2 Biochemische Betrachtung der Interaktion von Nck mit dem WAVE-Komplex

Eine Interaktion des Adapterproteins Nck mit dem WAVE-Komplex wurde bereits zuvor nachgewiesen. So wurde das WAVE-Komplex-Protein Nap1 als *Nck-associated-protein* identifiziert, da es in Immunpräzipitationen mit Nck angereichert worden ist (Kitamura et al., 1996). Eine direkte Bindung von Nck an Nap ist allerdings nicht möglich, da keine Prolin-reichen Regionen als Bindungsstelle für die Nck-SH3-Domänen in Nap existieren. Die einzigen möglichen Bindungspartner mit Prolin-reichen Regionen im WAVE-Komplex sind Abi1 und WAVE selbst. Daher ist eine genauere Analyse dieses Bindungsverhältnisses nötig.

3.2.1 Bindungsmotive der SH3-Domänen in WAVE-Komplex und N-WASP

Nachdem sich in vorangegangenen GST-Pulldowns die erste SH3-Domäne von Nck als maßgeblich für die Nck/WAVE-Komplex-Interaktion verantwortlich herausgestellt hat, soll nun deren genaue Bindungssequenz in WAVE und/oder Abi1 identifiziert werden. Hierfür wurde ein durch die Arbeitsgruppe um Ronald Frank (HZI) neu entwickeltes Peptid overlay assay-System etabliert und für die Nutzung mit SH3-Domänen angepasst (vgl.2.7.12). Dabei wird gelöste SH3-Domäne fusioniert mit GST über einen Glasobjektträger gegeben, auf den kurze Peptide der Poly-Prolin-Regionen von WAVE1, WAVE2, Abi1 und N-WASP immobilisiert wurden. Die Methode wurde kürzlich beschrieben (Beutling et al., 2008). In einem zuvor von Anke Fabian (HZI) durchgeführten ähnlichen Versuch mit einem herkömmlichen Zellulose-basierten Peptid overlay assay (Diss.Anke Fabian, 2005) konnten bereits die Bindungssequenzen der zweiten und dritten SH3-Domäne in N-WASP eingegrenzt werden (Abb.3.7).

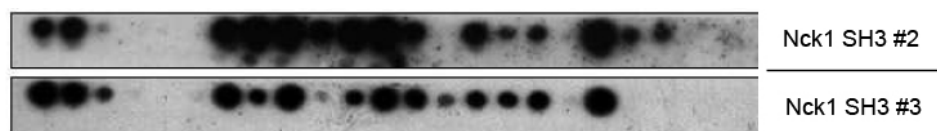


Abb.3.7: Peptide Overlay Assays von Nck1 SH3-Domänen (Diss. Fabian; 2005)

Die Abbildung zeigt Peptide Overlay Assays der 2. und 3. SH3-Domäne von Nck1 gegen Peptide aus N-WASP. Der gezeigte Array enthält die gleichen N-WASP- Peptide in gleicher Anordnung wie in den Reihen 12-13 in Abb.3.15 dargestellt.

Die Anordnung der hergestellten Peptide auf den Objektträgern ist in Abb.3.8 dargestellt.

Die Herstellung der GST-fusionierten SH3-Domänen erfolgte nach 2.7.5 – 2.7.7. Es wurden SH3-Domänen von Nck1, Nck2, Abi1, Eps8 und IRSp53 auf diese Weise hergestellt. Die Qualität der Aufreinigung war wie in vorrangegangenen Ansätzen sehr gut (Abb.3.1).

Der Biotin-Rahmen des *spotting*-Rasters wurde mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin sichtbar gemacht. Das neue Array-System zeigte sich wesentlich empfindlicher als das herkömmliche. Als optimale Konzentration gelöster GST-SH3-Domäne stellten sich letztlich 5µg/ml heraus (vergl. 250µg/ml bei den alten Arrays) . Die bisher angewandte Methode, die Peptid overlay assays über einen Peroxidase-gekoppelten GST-Antikörper (GE Healthcare) und Chemolumineszenz auf Röntgenfilm zu visualisieren, wies Schwächen in der Auswertbarkeit auf, da häufig die Nachweisgrenze erreicht oder unterschritten wurde und Unregelmäßigkeiten in der Signalverteilung auftraten (Abb.3.9).

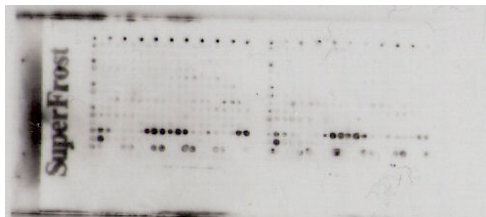


Abb.3.9: Peptide-array Interaktion mit 5µg/ml Nck1 SH3#2

Entwickelt mit optimierter SH3-Domänen-Konzentration. Zur Detektion gebundener Domäne wurde Peroxidase-gekoppelter α GST-Antikörper (GE Healthcare) eingesetzt.

Als alternative Methode zur Chemiluminiszenz für die Auswertung der Micro-Arrays wurde ein Cy5-markierter GST-Antikörpers (GE Healthcare) eingesetzt. Das Biotin-Raster wurde mit Streptavidin-Cy3 (Dianova) markiert. Mit dem verfügbaren Micro-Array Lesegerät Array Worx Auto-e konnten die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 direkt auf den Objektträgern ausgelesen werden. Hierzu waren allerdings erneut Anpassungen der Array-Herstellung erforderlich. Zum Einen wurden Objektträger mit verschiedenen vorbehandelten Oberflächen mit unbehandelten Objektträgern verglichen. Die vorher verwendeten BSA-vorbehandelten Objektträger wiesen stärkere unspezifische Anhaftung des verwendeten Cy5-gekoppelten Antikörpers auf, was sowohl optische als auch die geplante digitale Auswertung erheblich erschwerte. Zum anderen wurde erneut getestet, ob eine höhere Konzentration an GST-SH3 unter den neuen Bedingungen bessere Ergebnisse liefert

(Abb.3.10). Das Auftragsschema für die Peptide auf diese Objektträger ist in Abb.3.11 dargestellt.

5µg/ml wurde nach diesem Experiment wiederum als optimale Konzentration der SH3-Domänen festgestellt. Allerdings wurden bei der Herstellung neuer Arrays nur noch unbehandelte Objektträger verwendet.

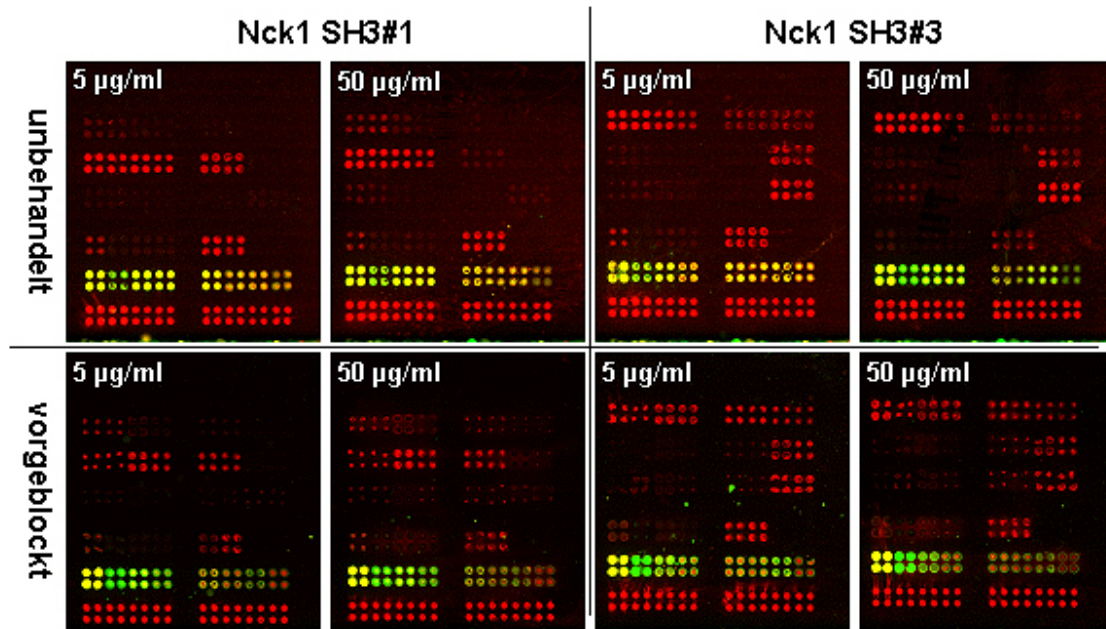


Abb.3.10: Test-Arrays mit SH3-Domänen #1 und #3 von Nck1

Test-Arrays unter verschiedenen Bedingungen. BSA-vorgeblockte oder unbehandelte Objektträger sowie 5µg/ml oder 50µg/ml SH3-Domäne. Die schlechtere Qualität der Arrays auf vorgeblockten Objektträgern (unten) ist deutlich zu erkennen.

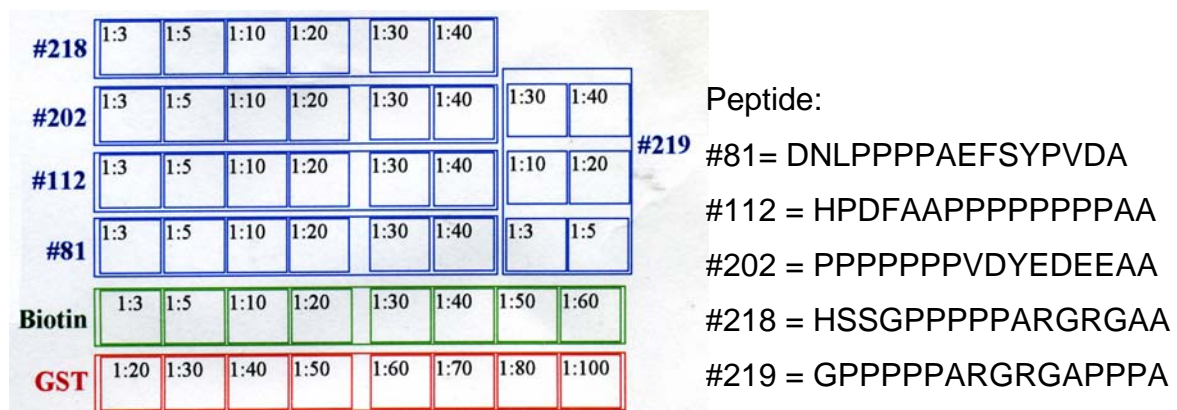


Abb.3.11: Peptid-Muster der Test-Arrays in Abb.3.10

Verwendet wurden die aus den vorhergegangenen Experimenten abgelesenen präferierten Peptide der ersten und dritten SH3-Domäne von Nck1 jeweils in den angegebenen Verdünnungen. Jedes Quadrat steht für 4 quadratisch angeordnete Peptidpunkte auf dem Objektträger.

Nach der Optimierung des Protokolls wurden die GST-fusionierten SH3-Domänen von Nck1, Nck2, Abi1, Eps8 und IRSp53 sowie unfusioniertes GST auf die neu hergestellten Peptid-Arrays gegeben. Die Peptidanordnung entspricht der in Abb. 3.8. Die ausgelesenen Objektträger sind in Abb.3.12 dargestellt. Die durchschnittlichen Bindungsstärken und die präferierten Peptide der einzelnen SH3-Domänen von Nck1 und Nck2 sind in Diagramm 3.3-3.5 einzusehen. Die Bindungssequenzen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Peptid-Scans

Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Peptid-Scans. Jede Spalte zeigt die Bindungsmotive der jeweils getesteten SH3-Domäne. Es fällt auf, dass die Consensussequenzen (Spalte ganz rechts) in WAVE und Abi1 sowie die Bindungssequenz für SH3-Domänen in N-WASP in den verwendeten Proteinen praktisch identisch sind. Die von IRSp53-SH3 gebundenen Peptide zeigen allerdings kein gemeinsames Motiv.

	WAVE1	WAVE2	Abi1	N-WASP	Konsensus
Nck1 SH3#1	-	P8AADY	P7VDY	-	P6xxDY
SH3#2	-	-	-	P5xR	P5xR
SH3#3	-	-	-	P5xR	P5xR
Nck2 SH3#1	-	P8AADY	P7VDY	-	P6xxDY
SH3#2	-	-	-	P5xR	P5xR
SH3#3	-	-	-	-	-
Abi1	-	-	-	P5xR	P5xR
Eps8	-	P8AADY	P7VDY	-	P6xxDY
IRSp53	STPPPPVP ₇ AA	P7GP ₅ FTA FPPHPDFAAP ₆ A	-	-	n/a
GST	-	-	-	-	-

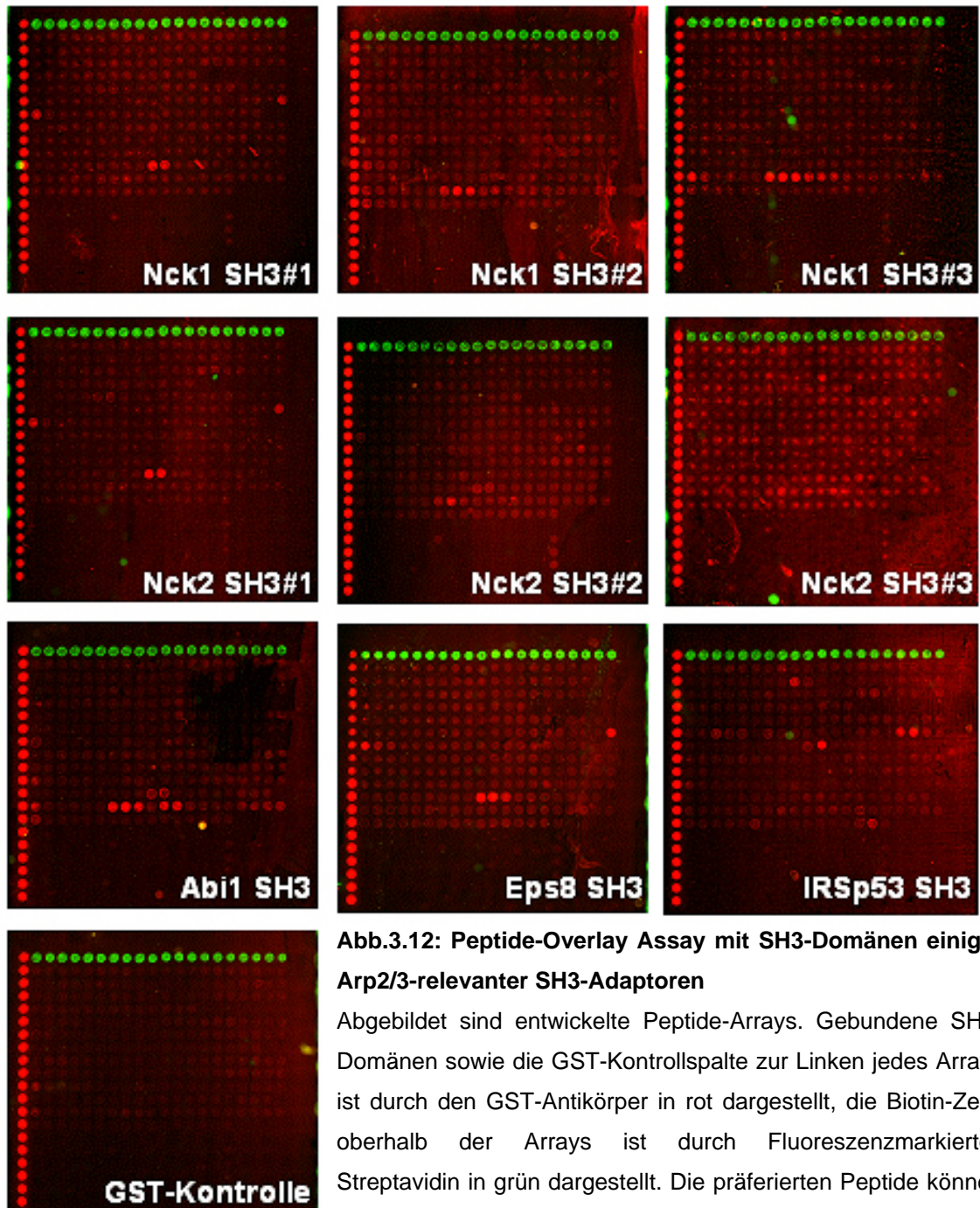
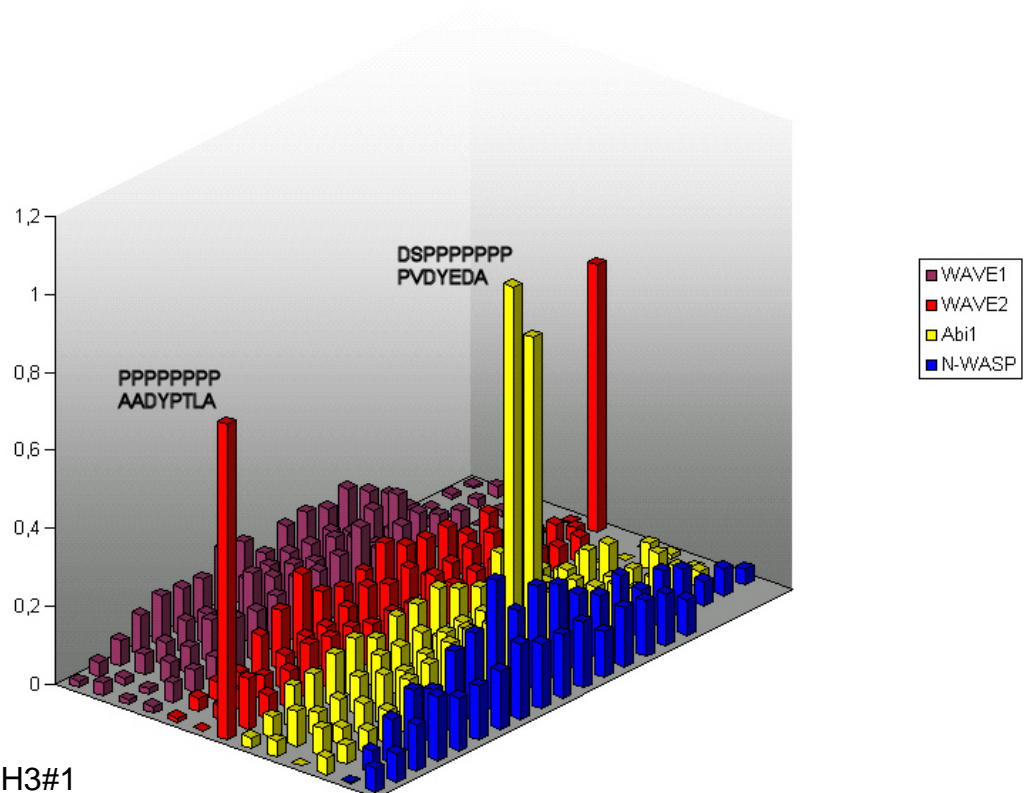
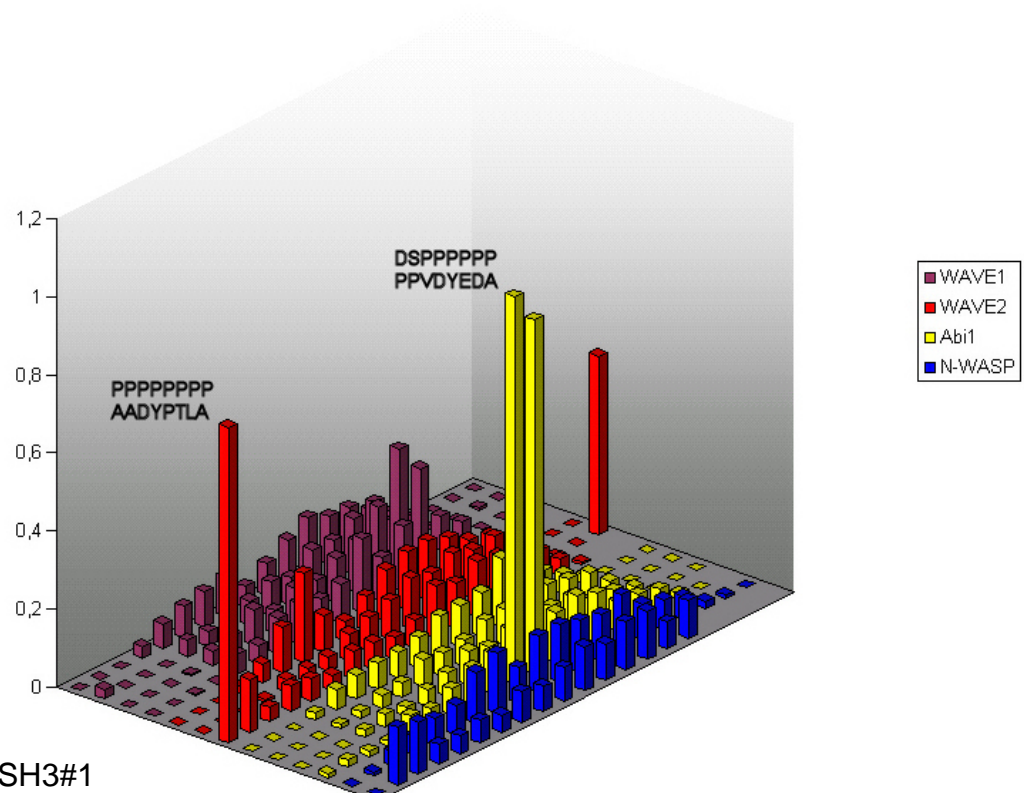


Abb.3.12: Peptide-Overlay Assay mit SH3-Domänen einiger Arp2/3-relevanter SH3-Adaptoren

Abgebildet sind entwickelte Peptide-Arrays. Gebundene SH3-Domänen sowie die GST-Kontrollspalte zur Linken jedes Arrays ist durch den GST-Antikörper in rot dargestellt, die Biotin-Zeile oberhalb der Arrays ist durch Fluoreszenzmarkiertes Streptavidin in grün dargestellt. Die präferierten Peptide können meist direkt abgelesen werden. Nck2 SH3#3 liefert ein diffuses Ergebnis, die GST-Kontrolle ist wie erwartet ohne Signal.

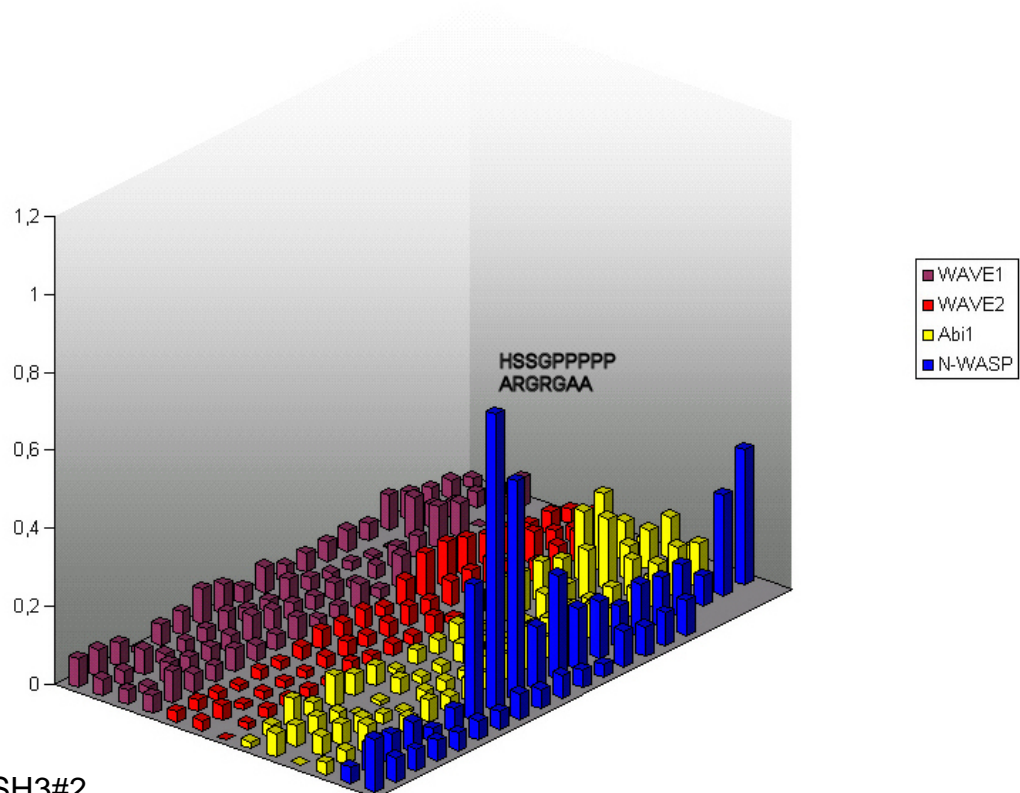


A Nck SH3#1

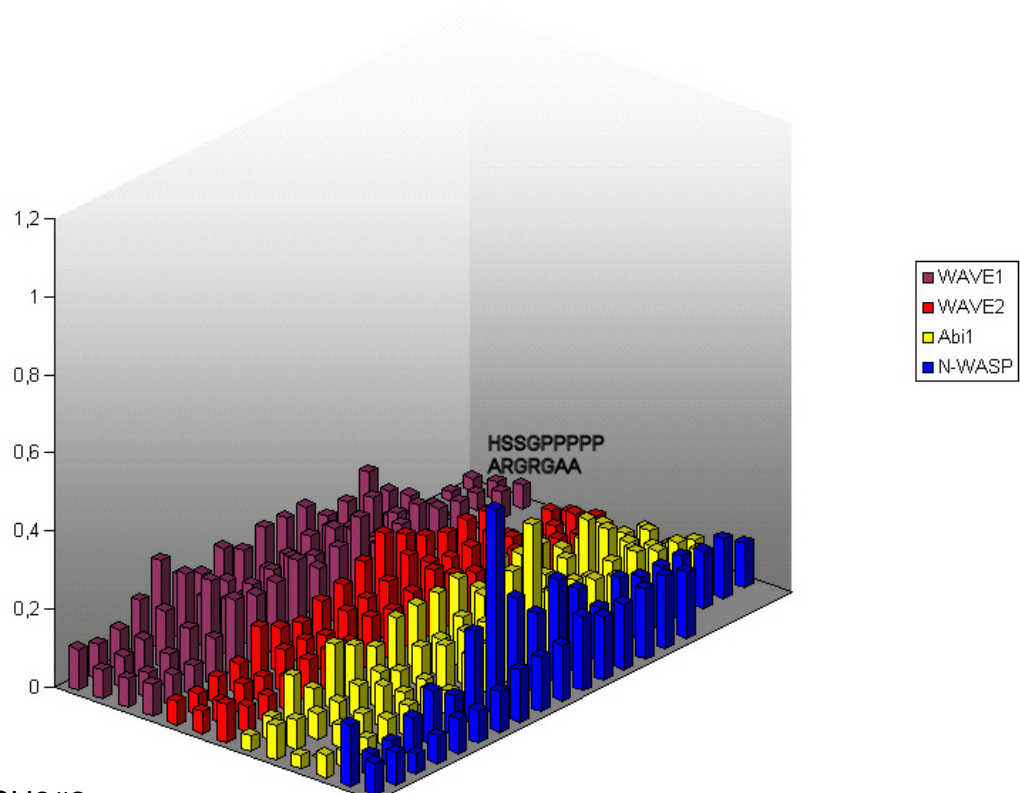


B Nck2 SH3#1

Diagramm 3.3: Dargestellt sind die Mittelwerte der Interaktionsstärken der **ersten** SH3-Domäne von Nck1 (A) und Nck2 (B) mit einzelnen Peptiden auf den verwendeten Arrays. Die Anordnung entspricht der auf den Objektträgern. Dazu wurden 4 Array-Bilder mit dem Programm Phoretix ausgewertet, die Signale gebundener SH3-Domänen mit dem jeweiligen GST-Standard verrechnet und alle Werte gemittelt. Abschließend wurden von den Mittelwerten die GST-Negativkontrolle subtrahiert. Die Peptide mit der örtlich höchsten Signalstärke sind im Diagramm vermerkt (vgl. Abb.3.8).

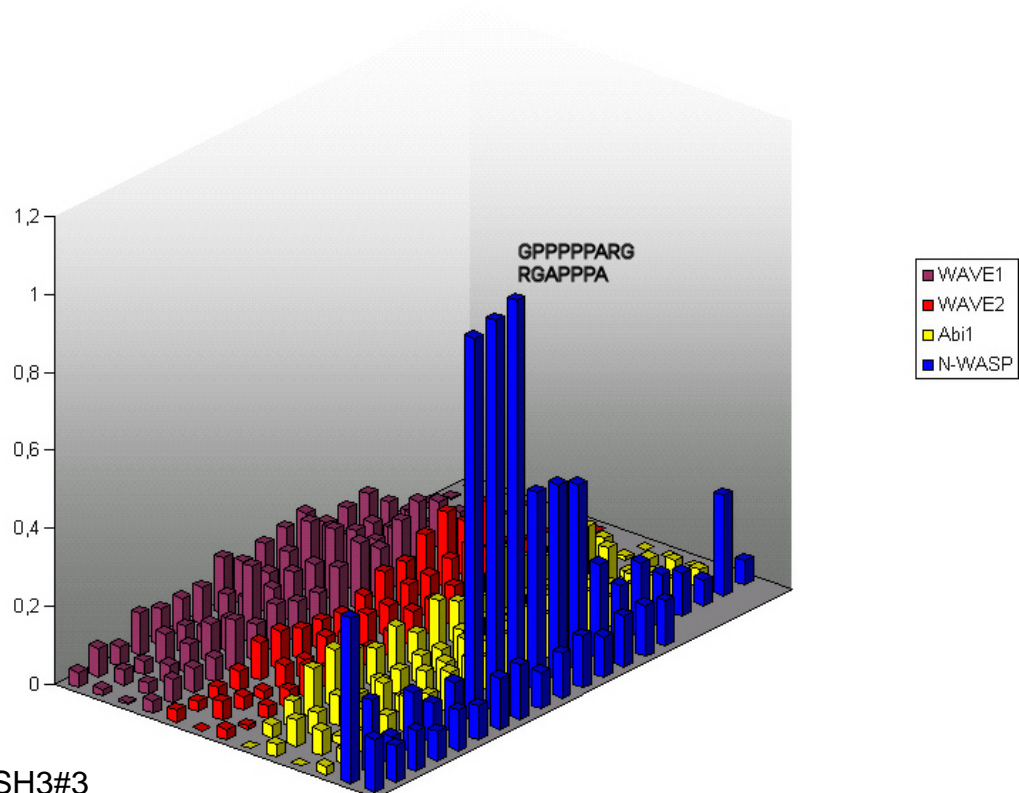


A Nck1 SH3#2

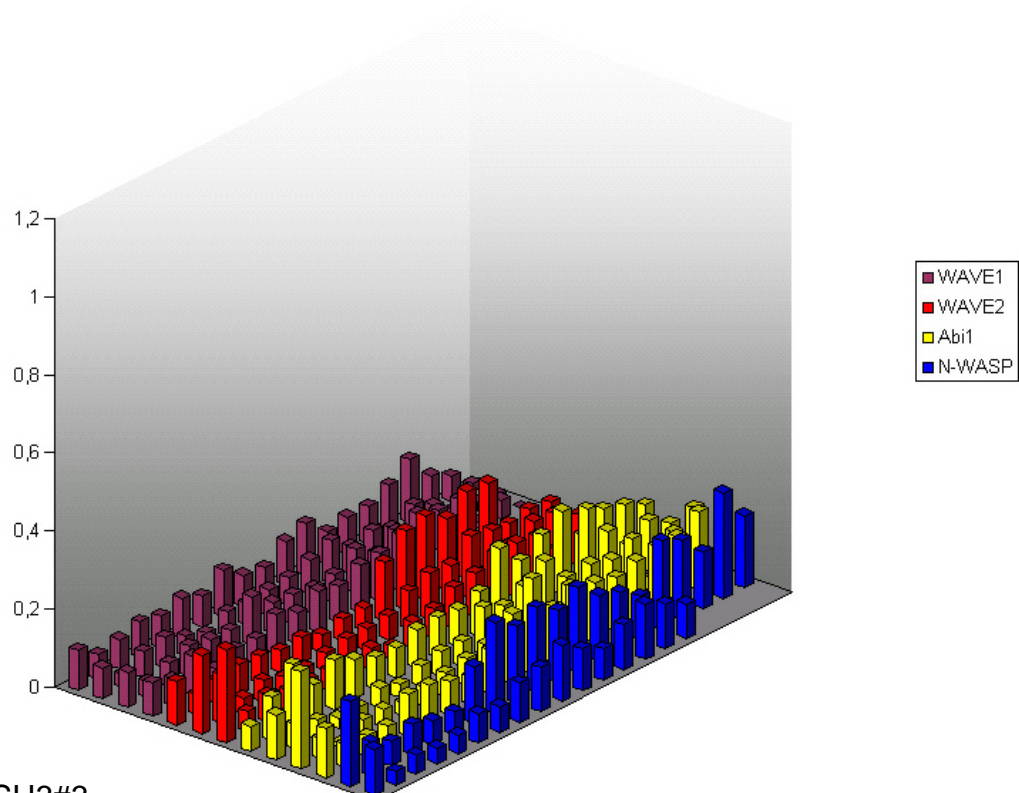


B Nck2 SH3#2

Diagramm 3.4: Dargestellt sind die Mittelwerte der Interaktionsstärken der **zweiten** SH3-Domäne von Nck1 (**A**) und Nck2 (**B**) mit einzelnen Peptiden auf den verwendeten Arrays. Die Anordnung entspricht der auf den Objektträgern. Die Auswertung erfolgte wie für Diagramm 3.5 beschrieben. Die Peptide mit der örtlich höchsten Signalstärke sind im Diagramm vermerkt (vgl. Abb.3.8).



A Nck1 SH3#3



B Nck2 SH3#3

Diagramm 3.5: Dargestellt sind die Mittelwerte der Interaktionsstärken der **dritten** SH3-Domäne von Nck1 (**A**) und Nck2 (**B**) mit einzelnen Peptiden auf den verwendeten Arrays. Die Anordnung entspricht der auf den Objektträgern. Die Auswertung erfolgte wie für Diagramm 3.5 beschrieben. Die Peptide mit der örtlich höchsten Signalstärke sind im Diagramm vermerkt (vgl. Abb.3.8). Die dritte SH3-Domäne von Nck2 zeigt nur sehr schlechte Bindungseigenschaften gegenüber den getesteten Peptiden.

Die zweiten und dritten Nck SH3-Domänen zeigen, wie erwartet, ähnliche Bindungseigenschaften wie in den vorangegangenen Versuchen auf Zellulose-basierten Arrays (vgl. Abb.3.7 und Abb.3.12). Allerdings waren die unspezifischen Bindungen von GST alleine oder den Domänen mit Peptiden auf Glasobjektträgern deutlich geringer, als die mit Peptiden auf Zellulosemembran. Die Kernsignale sind wesentlich stärker auf die tatsächliche Bindungssequenz P₅XR beschränkt. Die ersten SH3-Domänen von Nck weisen starke Signale in Peptiden von WAVE2 und Abi1, nicht aber in Peptiden von WAVE1 oder N-WASP auf. Als Consensusmotiv stellt sich hier P₆XXDY dar (wobei X hier für Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten steht). Dieses Motiv stimmt in den Peptiden von Abi1 mit der bevorzugten Bindungssequenz von Eps8 weitestgehend überein. Die SH3-Domäne von Abi1 zeigt ähnliche Bindungseigenschaften, wie die zweite und dritte SH3-Domäne von Nck. Für die ersten SH3-Domänen von Nck lässt sich nach diesen Versuchen folgende Hypothese aufstellen. Es wurde beschrieben, dass WAVE1 und WAVE2 beide eine redundante Funktion für den Arp2/3 Komplex in der Zelle übernehmen. Während in WAVE2 eine Konsensussequenz der ersten SH3-Domänen zu finden ist, fehlt sie in WAVE1. In früheren GST-Pulldowns mit Nck kam es allerdings zu einer Anreicherung von WAVE1. Daraus lässt sich schließen, dass die eigentliche Interaktion von Nck mit dem WAVE-Komplex auf dessen Interaktion mit Abi1 beruht. Für diese Hypothese sprechen ebenfalls die stärkeren Array-Signale der ersten SH3-Domänen in der Abi1-Peptidreihe gegenüber denen in der WAVE2-Peptidreihe. Dagegen spräche hingegen die Tatsache, dass auch die isolierte WAVE1-Prolinregion in einem Nck2-Pulldown anzureichern ist (Abb.3.17).

3.2.2 Vorbereitung auf GST-Pulldowns und Immunpräzipitationen

Für die folgenden Betrachtungen von Protein-Protein-Interaktionen anhand von GST-Pulldowns und Immunpräzipitationen mussten neue Reagenzien etabliert werden, die im Folgenden beschrieben werden. Für die GST-Pulldowns mussten GST-Fusionsproteine der Prolin-reichen Regionen von Abi1 sowie vollständiges Nck2 hergestellt werden. Alle weiteren GST-Konstrukte standen bereits aus anderen Arbeiten zur Verfügung. Für Immunpräzipitationen von Nck1/2 und WAVE2 sowie für die anschließenden Western-Blot Analysen wurden spezifische Antikörper benötigt. Daher wurde ein monoklonaler Nck Antikörper und ein polyklonales Serum gegen WAVE2 hergestellt und in den entsprechenden Methoden getestet. Für die genauere

Untersuchung der Funktion der einzelnen SH3-Domänen von Nck im vollständigen Protein wurden Mutanten von Nck2 hergestellt, die einen Defekt in jeweils einer oder in mehreren SH3-Domänen aufwiesen.

3.2.2.1 Klonierung und Expression von GST-Fusionsproteinen

Zunächst wurden sowohl die Polyprolin-Region (PP) von humanem Abi1 als auch humanes Nck2 aus den vorliegenden GFP- bzw. YFP-Konstrukten über PCR amplifiziert. Für Abi1-PP wurden die Primer A1PP5'EcoRI und A1PP3'Sall, für Nck2 die Primer Nck2BamHI5' und Nck2EcoRI3' (siehe 2.6.2) eingesetzt und PCRs wie in 2.6.3 durchgeführt (Abb.3.13). Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt und in pGEX-6P-1 (s.Abb.2.1) eingefügt. Eine Kontrolle der Konstrukte fand über einen Restriktionsverdau mit BamHI und EcoRI und über einen Expressionstest statt. Beide Fusionsproteine wurden wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben hergestellt, die Abi1-Polyprolin-Domäne wurde jedoch nicht für 4h bei 37°C, sondern über Nacht bei 20°C exprimiert.

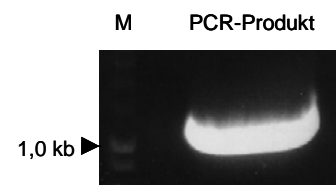


Abb.3.13: PCR-Produkt Nck2
Aufgereinigtes PCR-Produkt Nck2 mit BamHI und EcoRI Schnittstellen

3.2.2.2 Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen Nck2

Die Herstellung der Maus-Hybridoma-Zelllinie zur Gewinnung monoklonaler Nck2 Antikörper wurde von Marlies Konradt durchgeführt. Zur Immunisierung der Mäuse wurde rekombinantes Nck2 aus 3.2.1.1 verwendet, bei dem GST zuvor, wie in Kapitel 2.7.6 beschrieben, proteolytisch abgetrennt wurde. Von den hergestellten Hybridoma-Zelllinien zeigten sich 3 Klone im Western Blot als besonders vielversprechend (Abb.3.14). Die Ergebnisse wiesen keine relevanten Unterschiede zum kommerziellen Nck Antikörper (Transduction Laboratories) auf. Unterschiede in der Spezifität gegenüber Nck1 oder Nck2 konnten nicht festgestellt werden. Für die geplanten Versuche war die Funktionalität in der Immunpräzipitation wesentlich entscheidender. Insgesamt wurde jeder der 3 Klone (Abb.3.14A) und zusätzlich 6 resultierende Subklone (Abb.3.14B-D) in IPs getestet.

Für die folgenden Nck-Immunpräzipitationen wurden Antikörper aus den Subklonierungen 51C11 und 51F4 verwendet.

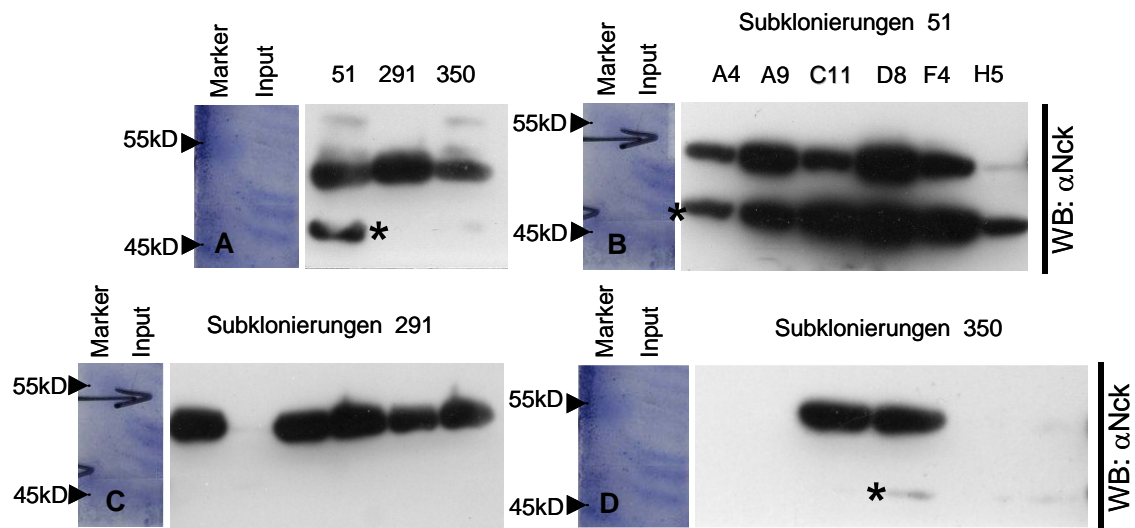


Abb.3.14: Test für α Nck Antikörper in der Immunpräzipitation (WB: α Nck, mc α Nck Transduction Labs)

Abgebildet sind entwickelte Immunblots der Pulldown-Proben (je 10 μ l). Unter A sind IPs mit den 3 im Western Blot funktionellen Klonen abgebildet, B-C zeigen IP-Proben der ausgewählten Subklonierungen. Die obere Bande stellt die schweren Ketten der IP-Antikörper, die untere (-) das präzipitierte Nck dar.

3.2.2.3 Charakterisierung eines polyklonalen Antiserums gegen WAVE2

Für die Herstellung der polyklonalen Antikörper wurde das Protokoll aus 2.7.13 verwendet. Ziel war die Generierung eines Antikörpers, der sowohl im Western Blot als auch in der Immunpräzipitation zu verwenden sein sollte. Die resultierenden Seren #1735 und #1736 zeigten starke Signale im Western Blot und wurden im

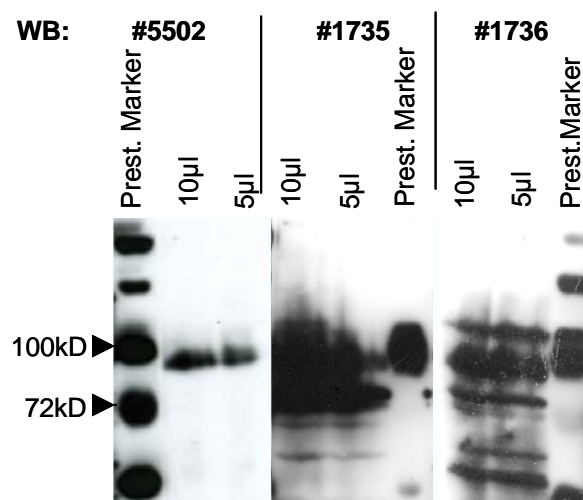


Abb.3.15: Antikörpertest pc α WAVE2 #1735 und #1736

Dargestellt sind Western Blots entwickelt mit den polyklonalen α WAVE-Antikörpern #1735 und #1736. Als Vergleich wurde der etablierte pc α WAVE-Antikörper #5502 eingesetzt. Alle Antikörper wurden 1:1000 eingesetzt. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ l und 5 μ l eines SDS-samples aus B16F1-Zellen.

Folgenden nicht höher konzentriert als $1:5 \times 10^4$ eingesetzt (vgl. Abb.3.15). Beide Seren erkennen allerdings nur denaturiertes WAVE-Protein im Western Blot, nicht aber natives Protein in der Immunpräzipitation. Daher musste für WAVE-IPs der noch in geringen Mengen zur Verfügung stehende polyklonale WAVE-Antikörper (von Giorgio Scita) eingesetzt werden.

3.2.3 GST-Pulldowns

Pulldown-Experimente, die in der vorangegangenen Arbeit durchgeführt worden sind, betrachteten nahezu ausschließlich die Interaktion zwischen immobilisierten SH3-Domänen und in B16F1-Zellen überexprimiertem GFP-gekoppeltem Zielproteinen. Um einen Überblick über die Interaktionen der betrachteten SH3-Domänen mit endogenem WAVE zu erhalten, wurden GST-Pulldowns mit den bereits vorhandenen GST-SH3-Köderproteinen aus untransfizierten B16F1-Zellen durchgeführt. Das Ergebnis entsprach den zuvor in der Diplomarbeit mit überexprimierten Proteinen erhobenen Daten (Abb.3.16).

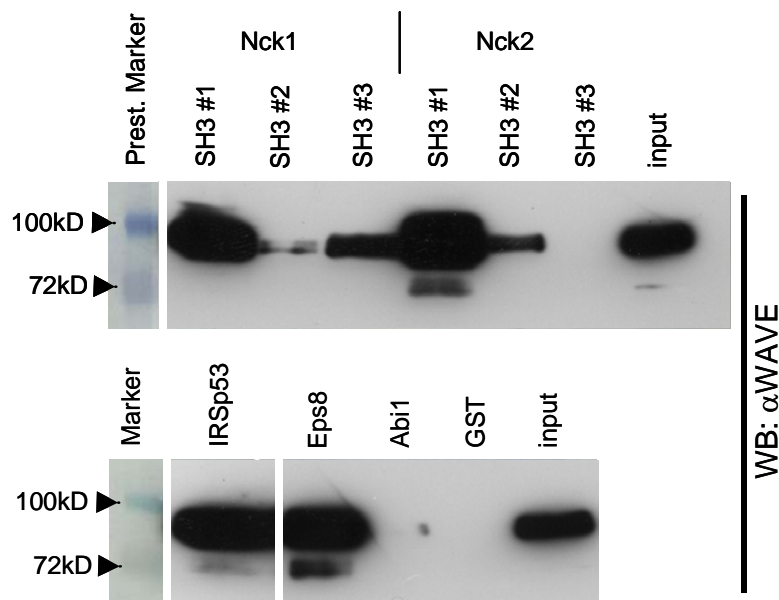


Abb.3.16: Endogenes WAVE in GST-Pulldowns mit isolierten SH3-Domänen (α WAVE, #5502)

Dargestellt sind entwickelte Immunblots (schwarz) mit dem Antiserum #5502. Die für den jeweiligen GST-Pulldown eingesetzte SH3-Domäne ist über den Blots notiert.

Die Interaktion von Nck mit dem WAVE-Komplex findet vorrangig über die erste SH3-Domäne von Nck statt, was bereits publizierten Hinweisen entspricht (Kitamura et al., 1996; Witke et al., 1998; Eden et al., 2002)

Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden die Interaktionen von vollständigem Nck mit den Polyprolin-Regionen prominenter Arp2/3-Aktivatoren der WASP/Scar-Familie untersucht. GST-Pulldowns mit Vollängen GST-Nck2 als Köderprotein von ektopisch exprimierten, GFP-markierten Poly-Prolin-Regionen dieser Proteine wurden durchgeführt. Dazu wurde GST-Nck2 wie in 3.2.1.1 hergestellt und nach 2.7.8.1 an Glutathion-Sepharose beads gekoppelt.

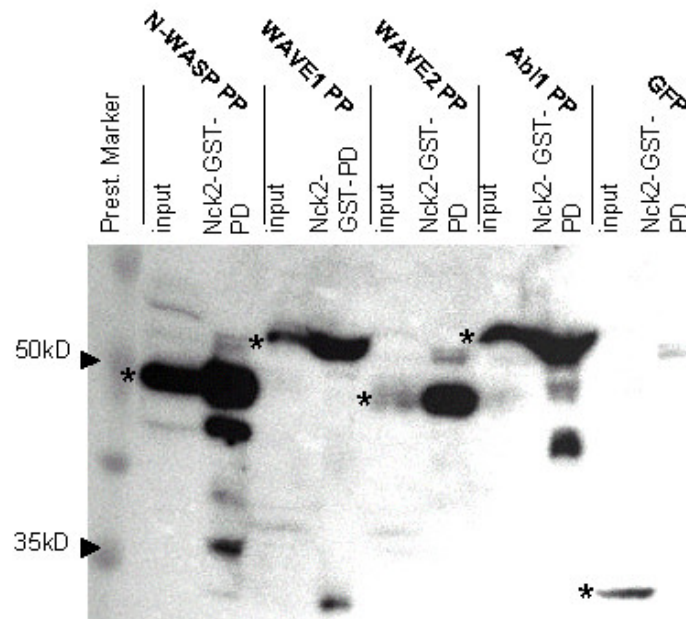


Abb.3.17: Überexprimierte GFP-Polyprolin-Regionen von WASP/Scar-Proteinen und Abi1 in GST-Pulldowns mit Nck2 (WB: α GFP, 101G4B2)

Dargestellt ist ein entwickelter Western Blot. Die für den GST-Pulldown überexprimierte PP-Region und GFP sind über der Abbildung notiert, die entsprechende Bande mit * markiert. In der Negativ- Kontrolle wurde kein GFP angereichert.

Die GFP-Polyprolin-domänen der angegebenen Proteine (vgl. Abb.3.17) wurden wie unter 2.8.5 beschrieben in die B16F1-Zellen transfiziert. Außer der Negativkontrolle (GFP) konnten alle 4 Prolin-reichen Regionen entsprechend den vorangegangenen Experimenten durch die Pulldowns angereichert werden (Abb.3.17).

In einem *vice versa* Experiment, bei dem GST-Pulldowns von überexprimiertem Nck und verwandten SH3-Adaptoren mit GST-fusionierter immobilisierter Polyprolin-Regionen von Abi1 präzipitiert wurden, bestätigte die zuvor erhaltenen Ergebnisse bezüglich einer starken Interaktion von Abi und Nck (Abb.3.18).

Anhand der Pulldown-Experimente lässt sich sagen, dass auch Vollängen-Nck mit den isolierten Polyprolin-Regionen der WAVE-Komplex-Proteine WAVE und Abi1 interagiert. Eine Regulation über das komplette Nck gegenüber den isolierten SH3-Domänen lässt sich hier jedoch nicht erkennen. Ein Unterschied in der Affinität zu WASP/N-WASP auf der einen und WAVE/Abi1 auf der anderen Seite lässt sich nicht feststellen. Dies mag zum Einen am unbehandelten Zustand der Zelle liegen, zum anderen an der Verwendung von Nck-Fusionsproteinen, die eventuelle

Mechanismen zur strukturellen Adaptation zur Bindung des einen Partners (N-WASP) oder des andern (WAVE-Komplex) aufheben könnten.

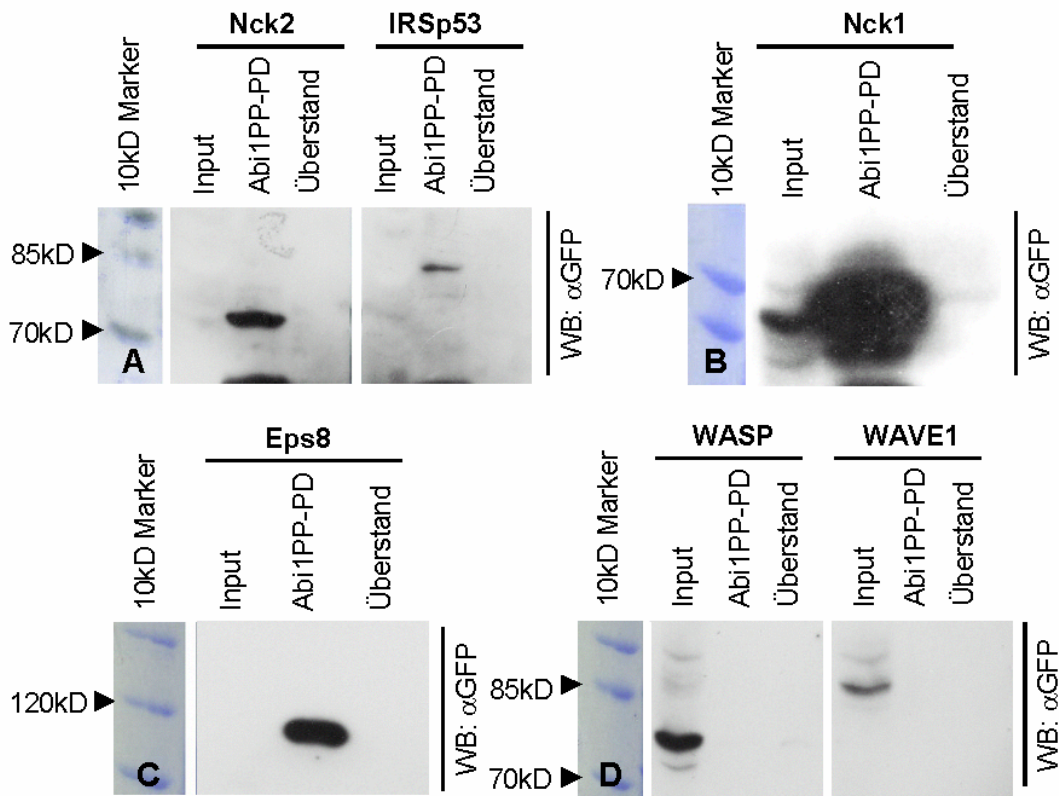


Abb.3.18: SH3-Adaptoren und WASP/Scar-Proteine in GST-Pulldowns mit Abi1-PP(α GFP 101G4B2)

Dargestellt sind die mit α GFP Antikörpern entwickelten Blots. Die ektopisch exprimierten mit GFP fusionierten SH3-Adaptoren sind. Sie wurden zur Detektion mit GFP fusioniert. Die Expressionslevel in A und B waren für ein input-Signal zu schwach. Als Negativ-Kontrolle wurden hier WASP und WAVE1 verwendet und wie erwartet nicht angereichert.

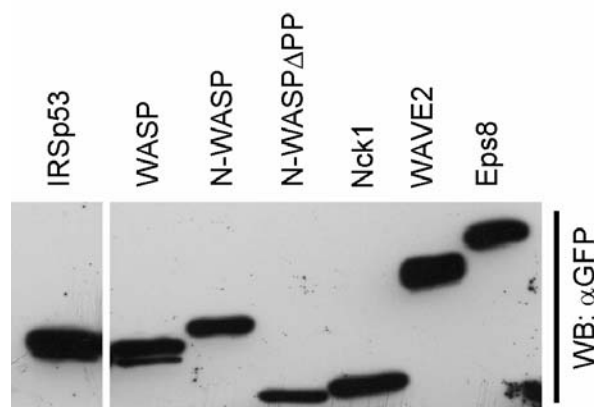


Abb.3.19: Expression der verwendeten GFP-Konstrukte (α GFP, 101G4B2)

Die Abbildung zeigt die Expression der verwendeten GFP-Konstrukte in B16F1-Zellen.

3.2.4 Immunpräzipitationen

Nachdem die Interaktion von Nck mit dem WAVE-Komplex in den GST-Pulldowns eindeutig gezeigt werden konnte, sollte sie in Immunpräzipitationen bestätigt und weiter untersucht werden. Hierfür wurden der monoklonale GFP-Antikörper 27F5 und der eigens hierfür hergestellte Nck2-Antikörper 51C11 aus 3.2.1.2 verwendet.

Zunächst wurde aus Lysaten von B16-Zellen, die mit verschiedenen GFP-markierten SH3-Adaptoren transfiziert worden waren, Immunpräzipitationen mit α GFP-Antikörpern durchgeführt. Die Ko-

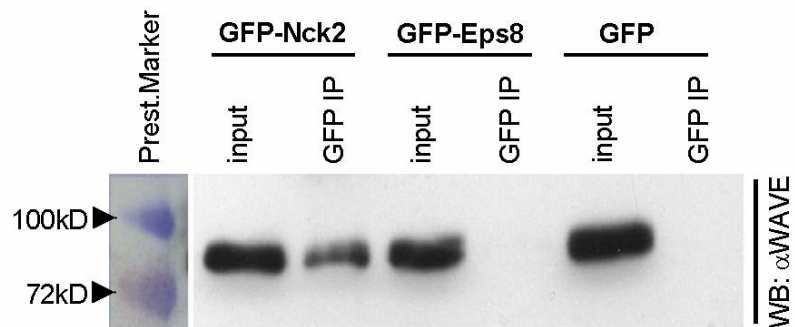


Abb.3.20: Kopräzipitation von WAVE in IPs von ektopisch exprimierten GFP-Nck2 und GFP-Eps8 (WB: α WAVE, #5502)

Für die IPs wurde ein α GFP Antikörper (27F5) verwendet.

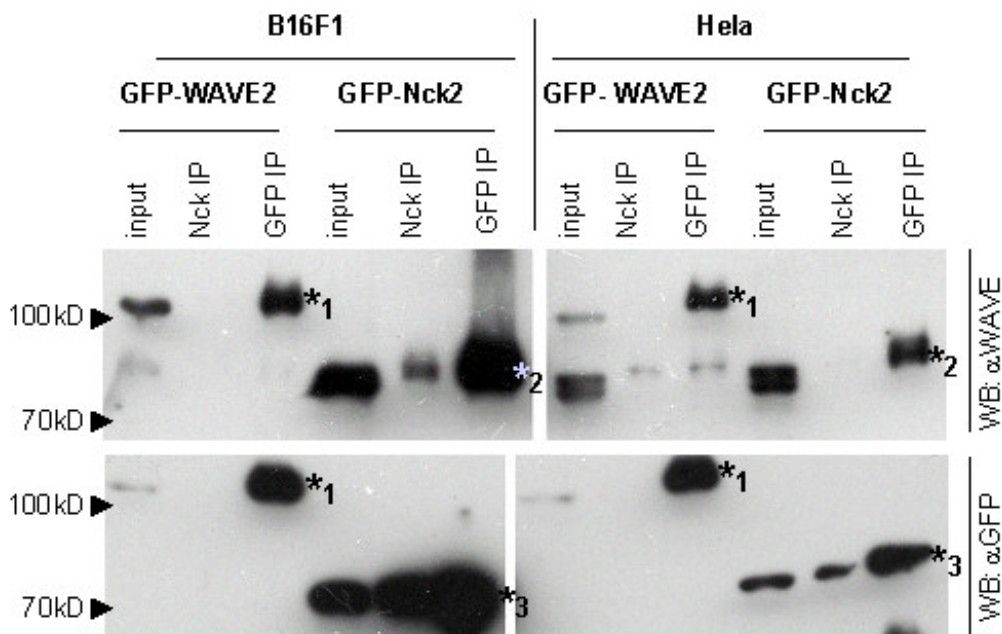


Abb.3.21: Immunpräzipitationen aus B16F1- und HeLa- Zellen mit überexprimierten GFP-WAVE2 und Nck2 (WB: α WAVE, #5502; α GFP, 101G4B2)

Die Immunblots zeigen die Kopräzipitation von endogenem WAVE bzw. überexprimiertem GFP-WAVE2 in IPs mit endogenem Nck (α Nck, 51C11) und der GFP-Fusionsproteine (α GFP, 27F5). Auffällig ist hier, dass die GFP-IP von GFP-fusioniertem Nck sowohl in B16F1- als auch HeLa-Zellen eine wesentlich stärkere Präzipitation endogenen WAVEs zeigt, als GFP-WAVE2 mit endogenem Nck.

präzipitation von WAVE-Komplex wurde über die Anwesenheit von endogenem WAVE kontrolliert. Auch hier zeigt sich eine deutliche Interaktion von Nck2 mit dem WAVE-Komplex (Abb.3.20), nicht aber mit Eps8 oder GFP alleine. Im nächsten Schritt wurden parallel sowohl α GFP- als auch α Nck-IPs aus Lysaten von B16F1 und zum Vergleich menschlichen Hela-Zellen durchgeführt, welche zuvor mit GFP-WAVE und GFP-Nck2 transfiziert worden waren (Abb.3.21).

Bei dieser Versuchsreihe ließ sich WAVE erneut mit überexprimiertem Nck sowohl in Nck-IPs als auch GFP-IPs eindeutig kopräzipitieren. In Hela erbrachte die Nck-IP aus GFP-Nck2 überexprimierenden Zellen nur ein sehr schwaches, kaum erkennbares Signal für WAVE im Western Blot. Auch in B16 ergab sich nach der Nck-IP ein deutlich schwächeres WAVE-Signal. Der Western Blot zeigte, dass die GFP-IPs mit GFP-Nck2 deutlich effizienter als die Nck-IPs sind. Ob das der einzige Grund für die stärkere Kopräzipitation von WAVE ist oder ob sterische Behinderungen der Interaktion mit WAVE durch den Nck-Antikörper ebenfalls eine Rolle spielten, kann in diesen Versuchen nicht geklärt werden. Weiterhin war auffällig, dass die Präzipitation von endogenem Nck aus GFP-WAVE exprimierenden Zellen nicht ausreichte, um endogenes oder überexprimiertes GFP-WAVE in repräsentativen Mengen zu präzipitieren. Dies ist eine Abweichung zu den bisherigen Beobachtungen. Endogenes Nck scheint unter normalen Bedingungen nicht in ausreichendem Ausmaß spontan mit dem WAVE-Komplex zu interagieren und diese Bindung darzustellen. Dies ist nicht weiter überraschend, da Nck an vielen Signalprozessen beteiligt ist und wirft die Frage auf, unter welchen Bedingungen die Nck/WAVE-Komplex-Interaktion eine Rolle spielt.

Eine Weiterführung der Versuche, bei denen IPs gegen endogenes Nck oder endogenes WAVE durchgeführt wurden, erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse. Dies ist auf eine Reihe von Hindernissen zurückzuführen, wie z.B. die niedrigen Expressionslevel der Proteine, die die Nachweisgrenze unterschritten. Zudem führt die geringe Bindungsstärke von SH3-Polyprolin-Interaktionen zu einer wesentlich geringeren Kopräzipitation der Zielproteine im Vergleich zu anderen Bindungen. Die Tatsache, dass beide Proteine noch eine ganze Reihe anderer Bindungspartner haben, die um die entsprechende Bindungsoberfläche konkurrieren, verringert die Effizienz der Kopräzipitation einzelner Proteine noch weiter.

3.2.5 IPs mit Nck-Mutanten

In den GST-Pulldowns wurde bereits die erste SH3-Domäne von Nck als primärer Interaktionspartner von WAVE/Abi1 identifiziert. Da für die Interaktion von Nck mit N-WASP ein synergistischer Effekt und ein Zusammenspiel aller drei SH3-Domänen beschrieben wurde (Rohatgi et al., 2001), sollte dies auch für Nck überprüft werden. Die obigen Versuche hatten nahegelegt, dass eine bisher unbekannte Regulation von Nck – möglicherweise über einen Liganden einer anderen SH3-Domäne oder der SH2-Domäne – die Effizienz der Interaktion unterdrückt. Um nun die Rolle der anderen beiden SH3-Domänen im Kontext des gesamten Nck-Moleküls für die Interaktion mit dem WAVE-Komplex zu untersuchen, wurden über gerichtete Mutagenese Punktmutationen in jeweils eine SH3-Domäne eingebracht. Es ist bekannt, dass ein Austausch des ersten Tryptophans in der Domäne gegen ein Lysin die Bindung an Polyproline unmöglich macht und die Struktur der Domäne stört. Vergleichbare Mutanten wurden in der Vergangenheit in zahlreichen Veröffentlichungen eingesetzt (Anton et al., 1998).

Als Template für die Herstellung der Konstrukte wurde das bereits zur Verfügung stehende GFP-Konstrukt von Nck2 (Nck in pCB6-GFP von Michael Way) eingesetzt und einer Mutagenese nach 2.6.13 unterzogen. Dabei wurden die Primerpaare N2'38K'fwd / N2'38K'rev, N148Kfwd02 / N148Krev02 sowie N2'234K'fwd / N2'234K'rev eingesetzt. Das resultierende Konstrukt Nck2W38K kodiert nun Nck mit einer funktionsuntüchtigen ersten SH3-Domäne (Δ SH3#1), Nck2W148K Nck mit einer funktionsuntüchtigen zweiten SH3-Domäne (Δ SH3#2) und NckW234K Nck mit einer funktionsuntüchtigen dritten SH3-Domäne (Δ SH3#3). Zusätzlich zu diesen drei Konstrukten wurde in Konstrukt NckW148K mit den Primern N2'234K'fwd / N2'234K'rev eine weitere Mutation eingefügt. Daraus resultierte ein Konstrukt NckW148/234K, bei dem die zweite und dritte SH3-Domäne defekt waren (Δ SH3#2/#3). Zur Kontrolle wurden die erhaltenen Klone über eine Sequenzierung (2.6.14) verifiziert (Abb.3.22).

Anschließend wurden die fertigen Mutanten, ein unmutiertes Nck2-Konstrukt als Positivkontrolle sowie GFP als Negativkontrolle in B16F1-Zellen transfiziert und GFP-IPs durchgeführt (Abb.3.23), und die Kopräzipitationen von endogenem WAVE bzw. N-WASP analysiert.

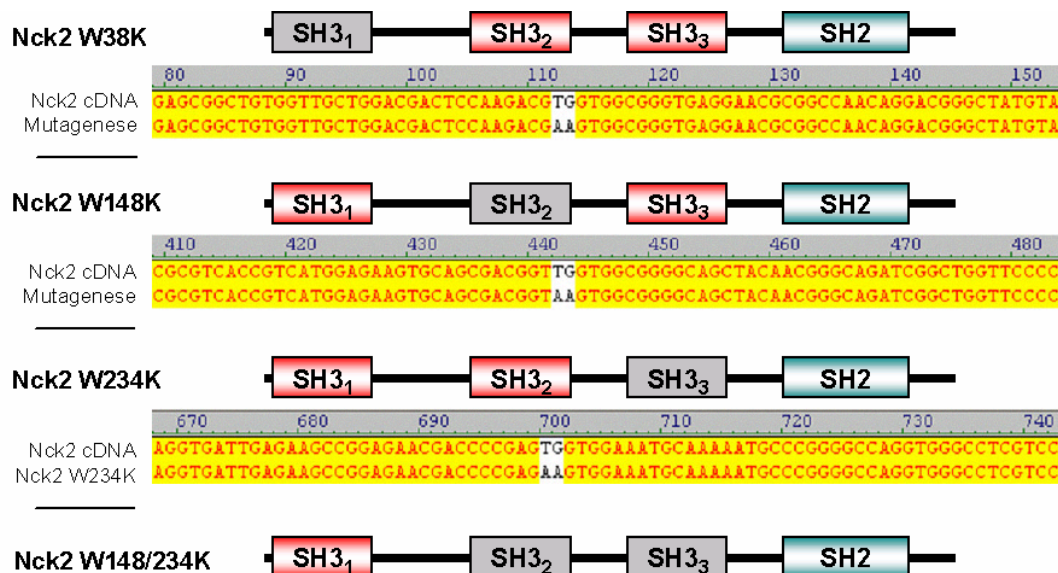


Abb.3.22: Sequenzierungen der Nck2-Mutanten im Vergleich mit Nck2 cDNA

Dargestellt sind *alignments* der Sequenzierungen zuvor hergestellter Mutanten von Nck2. Es wurde jeweils das Codon für das erste Tryptophan in jeder SH3-Domäne gegen ein Lysin-Codon ausgetauscht. Bis auf die dargestellten Mutationen und wenige stumme Punktmutationen gibt es keine Abweichungen von der ursprünglichen cDNA.

Die Bindungsfähigkeiten von GFP-Nck2 wurde mit den jeweiligen Nck2-Mutanten im Western Blot direkt verglichen. Dort zeigte sich, dass auch im Kontext des Vollängenproteins ausschließlich die erste SH3-Domäne für die Bindung an den WAVE-Komplex verantwortlich ist. Die Interaktion von Nck2 mit WAVE wird durch

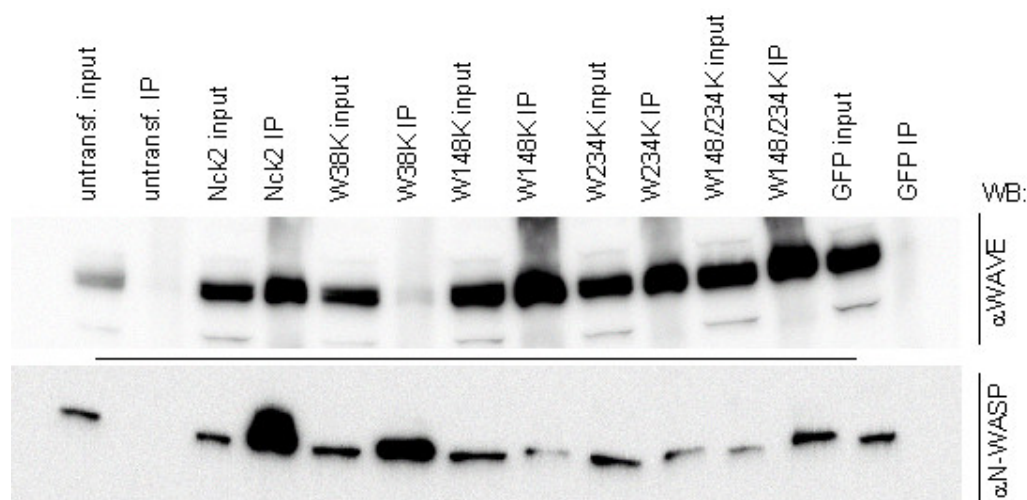


Abb.3.23: Immunpräzipitationen von Nck2-Mutanten mit defekten SH3-Domänen (WB: αWAVE, pc #5502; αN-WASP, mc 32A2)

Die Abbildung zeigt Unterschiede in der Kopräzipitation von WAVE (oben) und N-WASP (unten) mit den über den Blots angegebenen Nck2-Mutanten. Es wurde jeweils untereinander dargestellt, die gleiche Probe aufgetragen, so dass die Ergebnisse hier direkt vergleichbar sind.

Mutation der zweiten und/oder dritten SH3-Domäne nicht abgeschwächt sondern evtl. sogar verstärkt. Dies unterstützt die o.g. Hypothese einer negativen Regulation der WAVE-Interaktion durch Liganden der zweiten oder dritten SH3-Domäne. Im Gegensatz dazu belegt die Kopräzipitation von N-WASP bisherige Erkenntnisse, wonach vor allem die zweite und die dritte SH3-Domäne für die Nck/N-WASP-Interaktion von Bedeutung sind, aber nur alle 3 Domänen gleichzeitig die volle Effizienz der Interaktion erbringen.

3.2.6 Auswirkung von PDGF auf die Nck/WAVE-Komplex-Interaktion

Die meisten bisher publizierten Erkenntnisse betreffen eher Nck/N-WASP Interaktion und die Aktivierung Arp2/3-Komplex-vermittelter Aktinpolymerisation. Da die Interaktionen von Nck mit N-WASP und Nck mit dem WAVE-Komplex nicht simultan möglich sind, stellt sich die Frage, wie zeitlich und räumlich über die Interaktion entschieden wird.

N-WASP kann durch Nck an phosphorylierte Tyrosine rekrutiert werden, wie sie zum Beispiel in Proteinen einiger Pathogene oder Rezeptoren vorkommen (vgl.1.9). Während Nck und N-WASP beide dort nachgewiesen werden können (z.B. an EPEC-Pedestals, Vaccinia Virus, EGFR-Endozytose), kolokalisiert der WAVE-Komplex unter diesen Bedingungen nicht mit Nck. Zudem kolokalisiert Nck nicht mit aktivem WAVE-Komplex an der lamellipodialen Spitze. Daraus kann man schließen, dass die Nck/WAVE-Komplex-Interaktion nicht direkt mit dem aktiven Zustand des WAVE-Komplexes zusammenhängt. Um zu überprüfen, ob die Interaktion für die Aktivierung wichtig ist, also der Aktivität vorausgeht, oder einer negativen Regulation dient, wurden folgende Annahmen gemacht und dementsprechende Experimente geplant:

Infolge der Stimulation von Zellen mit PDGF und der daraus resultierenden PDGF-Rezeptor-Phosphorylierung wurde zum Einen eine Phosphorylierung von WAVE (Miki et al., 1999), zum Anderen eine starke Reaktion des Aktinzytoskelett in Abhängigkeit von Nck beobachtet (Rivera et al., 2006).

Zunächst wurde überprüft, ob die Phosphorylierung von WAVE in einem 7,5% Agarose-Gel eindeutig dargestellt werden kann. Dazu wurden NIH3T3-Zellen über 24 Stunden in Serum-freien Medium verhungert, danach mit PDGF stimuliert und zur Kontrolle mit dem Phorbolster Tetradacanoyl-Phorbolacetat (TPA) behandelt. Die TPA-Behandlung bewirkt eine konstitutive Aktivierung einer ganzen Reihe von

Kinasen, was eine Hyperphosphorylierung der meisten zellulären Proteine, also auch WAVE, zur Folge hat. In Abb.3.24 ist diese Phosphorylierung von WAVE anhand der Größenänderung zum unphosphorylierten WAVE aus verhungerten Zellen zu erkennen. WAVE aus den PDGF-behandelten Zellen hat hier die gleiche Größe wie die TPA-Kontrolle.

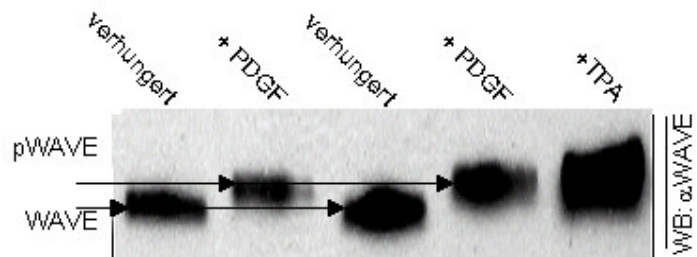


Abb.3.24: Phosphoryliertes und unphosphoryliertes WAVE im Western Blot (α WAVE,#5502)

Dargestellt ist ein Western Blot von NIH3T3-Lysat aus verhungerten, PDGF-stimulierten und TPA-behandelten Zellen (Kontrolle). Unphosphoryliertes WAVE (untere Banden) ist etwas kleiner und läuft somit schneller durch das Gel, als phosphoryliertes WAVE.

Um das Bindungsverhältnis von Nck und WAVE-Komplex unter diesen Bedingungen zu testen, wurden NIH3T3-Zellen wie oben über 24 Stunden in Serum-freien Medium verhungert, danach mit PDGF stimuliert und anschließend Immunpräzipitationen gegen Nck oder WAVE durchgeführt.

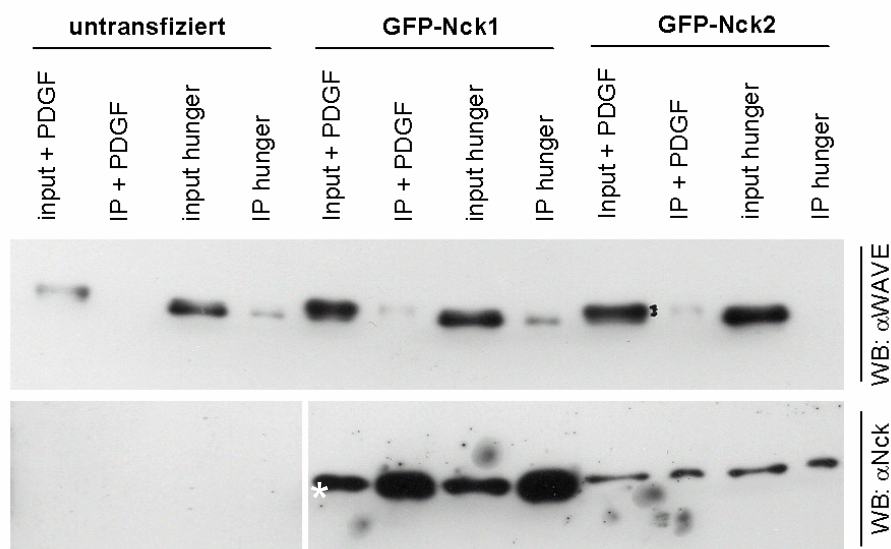


Abb.3.25: Nck-IPs aus verhungerten und PDGF-stimulierten NIH-Zellen (WB: α WAVE ,#5502; α Nck, mc α Nck Transduction Labs)

Dargestellt ist ein Western Blot der kopräzipitiertes WAVE in Immunpräzipitationen von Nck (α Nck, 51C11) zeigt. Die Co-Präzipitation von WAVE fällt aus verhungerten NIH sowohl mit endogenem Nck, als auch überexprimiertem GFP-Nck1 größer aus, als bei PDGF-stimulierten NIH. Der α Nck-WB zeigt die erfolgreiche Anreicherung von GFP-Nck (*) in der IP. Endogenes Nck lag in diesen Versuchen meist unterhalb der Nachweisgrenze.

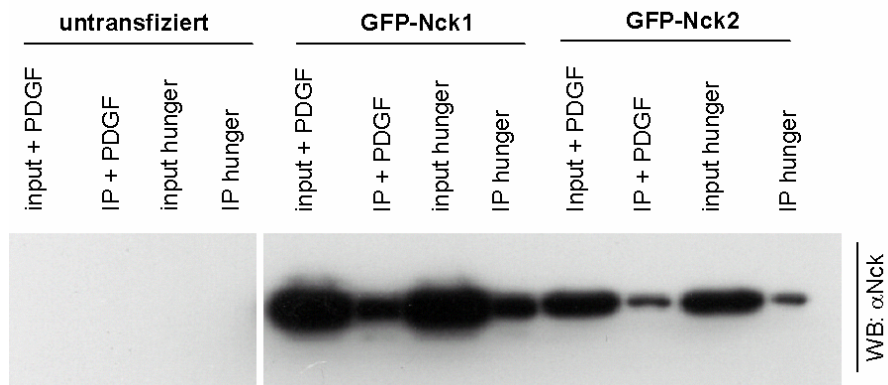


Abb.3.26: WAVE-IPs aus verhungerten und PDGF-stimulierten NIH-Zellen (WB: αNck, mc αNck Transduction Labs)

Dargestellt ist ein Western Blot von WAVE-IPs (αWAVE, pc „Giorgio Scita“) aus verhungerten und PDGF-stimulierten NIH3T3-Zellen. Es sind keine Unterschiede in der Kopräzipitation von GFP-Nck im verhungerten oder PDGF-stimulierten Zustand erkennbar.

In den Immunpräzipitationen von endogenem Nck und überexprimiertem GFP-Nck1 aus verhungerten und PDGF-stimulierten Zellen zeigt sich im Western Blot ein Unterschied in der Kopräzipitation von WAVE (Abb.3.25). Während in den IP-Proben aus stimulierten Zellen praktisch kein WAVE kopräzipitiert worden ist, so erkennt man eine deutliche WAVE-Bande in den Proben aus verhungerten Zellen. Dies gilt für die Proben aus untransfizierten NIH3T3 wie für GFP-Nck1-exprimierende Zellen gleichermaßen.

In *vice versa* Experimenten wurde getestet, ob endogenes Nck mit WAVE oder N-WASP kopräzipitiert. In WAVE-IPs aus verhungerten und PDGF-stimulierten NIH3T3-Zellen zeigt sich kein Unterschied im Ausmaß der Kopräzipitation von endogenem Nck oder überexprimiertem GFP-Nck1 und GFP-Nck2. Der WAVE-Phosphorylierungszustand hat keinen Einfluss auf die Nck/WAVE-Kopräzipitation (Abb.3.26). Endogenes

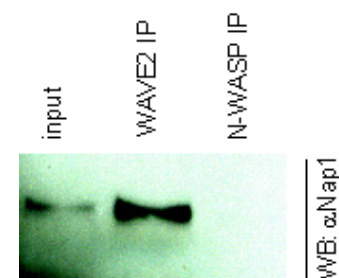


Abb.3.27: Kontrolle der WAVE IPs (WB: αNap1, #4952)

Präzipitation von WAVE-Komplex in IPs mit αWAVE, pc „Giorgio Scita“ und αN-WASP, mc 32A2. (vgl. 3.28)

Nck konnte in diesem Versuch weder als Kopräzipitat, noch in größerem Maße im Input nachgewiesen werden.

Bei der Wiederholung und Ergänzung des Versuchs wurde zum Einen zusätzlich zu den WAVE-IPs noch eine analoge Reihe von N-WASP-IPs durchgeführt. Mit diesem Antikörper konnte nun auch endogenes Nck nachgewiesen werden. Zudem erlaubt dieser Ansatz einen direkten Vergleich der Bindungsfähigkeit von Nck gegenüber

WAVE und N-WASP aus stimulierten und unstimulierten Zellen (Abb.3.28). Eine exemplarische Kontrolle der WAVE-IP ist in Abb.3.27 dargestellt.

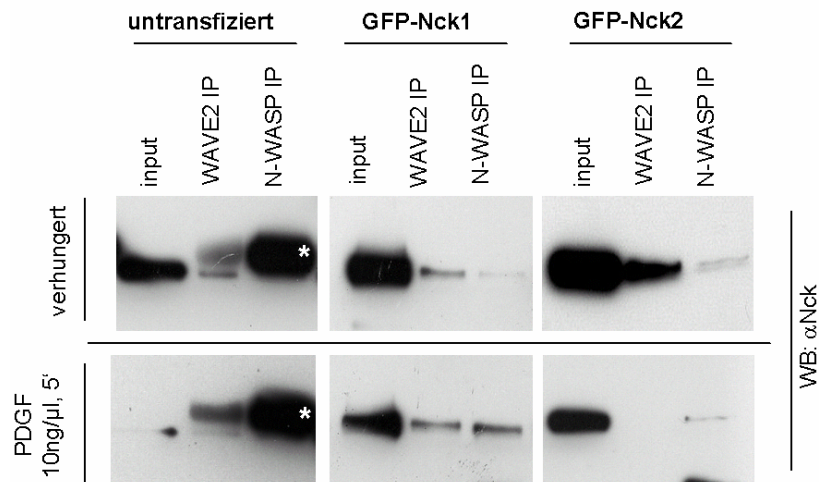


Abb.3.28: WAVE2- und N-WASP-IPs aus verhungerten und PDGF-stimulierten NIH3T3 (WB: α Nck, mc α Nck Transduction Labs)

Dargestellt sind Western Blots von WAVE2- und N-WASP-IPs (α WAVE, pc „Giorgio Scita“, α N-WASP, mc 32A2) aus verhungerten und PDGF-stimulierten NIH3T3 Zellen. In den IPs aus untransfizierten Zellen wurde endogenes Nck, in den GFP-Nck1/2 exprimierenden Zellen das jeweilige GFP-Konstrukt betrachtet. In diesen Blots sind kaum Unterschiede in der Kopräzipitation von Nck bzw. von GFP-Nck mit N-WASP im verhungerten oder PDGF-stimulierten Zustand erkennbar, wohl aber in der Co-Präzipitation von Nck und GFP-Nck mit WAVE. Diese erscheint bei allen drei Betrachtungen im verhungerten Zustand größer. Das * markiert die schwere Kette des verwendeten Antikörpers, die nur wenig oberhalb von endogenem Nck im Blot zu sehen ist.

Es zeigt sich eine deutlich stärkere Kopräzipitation von Nck in den N-WASP-IPs im Vergleich zu WAVE-IPs.

Anhand der in Abb.3.28 gezeigten Western Blots lässt sich die zuvor genannte Beobachtung, dass die Nck/WAVE-Interaktion in verhungerten Zellen stärker ist als in PDGF-stimulierten, bestätigen. Die Interaktion zwischen N-WASP und Nck erscheint in untransfizierten und GFP-Nck1-exprimierenden Zellen PDGF-unabhängig.

Um die Interaktion von überexprimiertem GFP-WAVE (vgl. 3.21) und GFP-Abi mit Nck unter diesen Bedingungen (stimuliert gegenüber verhungert) zu untersuchen, wurden Nck-IPs aus entsprechend behandelten NIH3T3-Zellen durchgeführt, welche WAVE2, Abi1 sowie die Prolin-reichen Regionen dieser Proteine als GFP-Fusionen exprimieren. Interessanterweise ist nach Überexpression von GFP-Abi1 die Kopräzipitation von endogenem WAVE mit Nck im PDGF-stimulierten Zustand größer, als im verhungerten (Abb.3.29). GFP-Abi1 selbst wird im verhungerten Zustand

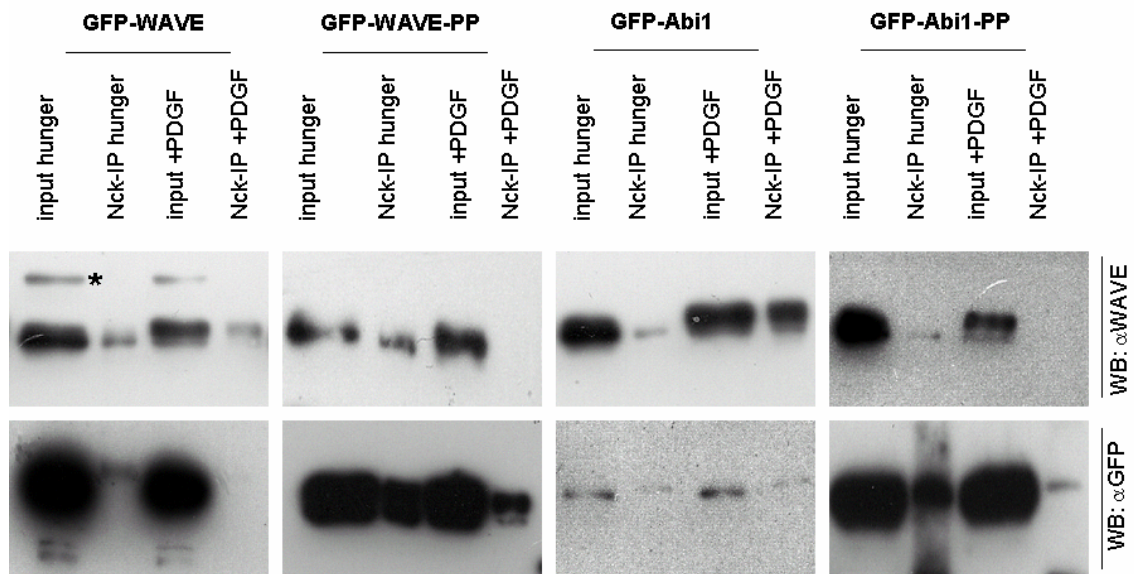


Abb.3.29: Manipulation der Nck/WAVE-Interaktion durch Überexpression der potentiellen Interaktoren (WB: α WAVE, #5502; α GFP, 101G4B2)

Dargestellt sind Western Blots von in Nck-IPs (α Nck, 51C11) kopräzipitiertem WAVE und den GFP-Konstrukten von WAVE, Abi1 sowie der Prolinreichen Regionen dieser Proteine. In den oberen Western Blots wurde die Kopräzipitation von endogenem WAVE bei Überexpression der jeweiligen GFP-Konstrukte nachgewiesen, im unteren Western Blot das jeweils in der gleichen IP kopräzipitierte GFP-Konstrukt.

weitaus besser kopräzipitiert. Daraus kann man schließen, dass WAVE unter diesen Bedingungen nicht über GFP-Abi indirekt an Nck bindet, sondern tatsächlich an Nck. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Bindung von Nck an WAVE-Komplex-Komponenten in verhungerten Zellen prominenter ist, als nach Stimulation. Dies deckt sich mit den allgemeinen Erkenntnissen über Lokalisation und sich gegenseitig ausschließenden Interaktionen von Nck mit WAVE und N-WASP.

3.3 Betrachtung der Interaktion von Nck mit dem WAVE-Komplex in intakten Zellen

Um die Auswirkungen von Nck auf den WAVE-Komplex bzw. WAVE-Komplex-vermittelte Aktinpolymerisation unter Berücksichtigung PDGF-stimulierter Lamellipodien in lebenden Zellen zu untersuchen, sollte die Nck1/2 k.o.-Linie #19 mit den in 3.2.4 hergestellten Nck2-Mutanten und einem unveränderten Nck2 rekonstituiert werden. Bei dieser Zelllinie wurden sowohl das Nck1- als auch das

Nck2-Gen zunächst nacheinander mit *loxP*-Sequenzen flankiert und später über Cre-Rekombinase aus beiden Allelen herausgeschnitten. Dies hatte eine homozygote Deletion beider Gene zur Folge (vgl.3.4). Für die Rekonstitution wurden zunächst die bereits vorhandenen GFP-Konstrukte verwendet. #19-Zellen wurden nach 2.8.5 transfiziert, wiesen aber unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet sehr geringe Transfektionsraten auf. Nur in 2-3% der Zellen war GFP-Fluoreszenz zu erkennen. Die Zellen wurden aus diesem Grund mehrfach (10x) in einem Cell-sorter (MoFlo, Beckmann Coulter) nach GFP-Expression sortiert, bis eine stabile GFP-Expression von über 95% erreicht war. Die sortierten Zellen wurden dann wie unter 2.8.2 auf Deckgläschen ausgesät und wie in 2.8.6 verhungert bzw. stimuliert. Abschließend wurden nach 2.8.8 Präparate hergestellt und am Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zusätzlich zu den sortierten transfizierten Zellen und den untransfizierten #19 Kontrollzellen wurde auch die Vorläuferzelllinie #13 verwendet, bei der nur ein Allel von Nck1 und Nck2 deletiert ist, während das andere noch *loxP*-flankiert – und damit funktionstüchtig – vorliegt. Nach Rivera et al. (2006) war in diesem Versuch zu erwarten, dass durch Expression von Nck2 in den Nck-k.o. Zellen deren Verhalten nach Serumentzug und anschließender PDGF-Stimulation wieder dem der Vorläuferzelllinie #13 gleicht. Eine derartige Rekonstitution konnte allerdings nach 3 Versuchsansätzen nicht beobachtet werden. Der Grund dafür wurde in der Fusion von GFP und Nck2 bzw. den Nck2-Mutanten vermutet. Es wurde davon ausgegangen, dass die zelluläre Funktion von Nck, welches mit GFP fusioniert ist, sterisch beeinträchtigt ist und nicht mehr alle Bindungen eingehen kann. Dass eine Rekonstitution von Nck-k.o.-Zellen mit nicht fusioniertem Nck im Prinzip möglich ist, wurde in Rivera et al., 2006 gezeigt (siehe 1.6).

Aufgrund dieser Annahme wurden sowohl Nck2, als auch alle Mutanten in den pIRES-GFP-Vektor umklontiert. Hierbei sind die Nck2-Varianten (*multiple cloning site A*) und das für die Sortierung notwendige GFP (*multiple cloning site B*) durch eine IRES-Sequenz voneinander getrennt und werden so nicht als ein Fusionsprotein sondern als zwei Proteine, wenn auch von einer mRNA, exprimiert.

Entsprechend wurden erneut #19-Zellen mit diesen Konstrukten transfiziert und so lange sortiert, bis eine Transfektionsrate von >95% erreicht war. Die sortierten Zellen wurden dann wie oben auf je 4 Deckgläschen ausgesät. Anschließend wurden alle Zellen verhungert und die Hälfte stimuliert. Die Deckgläschen wurden dann nach 2.8.8 für die Immunfluoreszenz präpariert.

Unter dem Epifluoreszenzmikroskop wurden jeweils 300 Zellen ausgezählt und nach Ausbildung von dorsalen *ruffles* in 3 Kategorien eingeteilt: „keine *ruffles*“, „nicht eindeutig“ und „*ruffling* vorhanden“.

Während die untransfizierten #19-Zellen nur sehr geringe morphologische Unterschiede vor und nach der PDGF-Stimulation aufwiesen, zeigten die #13-Zellen nach Stimulation mit PDGF eine deutliche Antwort in Form von dorsalen *ruffles*. Demzufolge war bei den untransfizierten #19-Zellen nur in 3% der Zellen dorsales *ruffling* zu beobachten (Abb.3.30A), in den #13-Kontrollzellen sind es 74% (Abb.3.30B). Durch Expression von Nck2 lässt sich die PDGF-Antwort verglichen mit den #13-Zellen zu 55% rekonstituieren (Abb.3.30C). Bei Expression von Nck2W38K sind es nur 15%, d.h., dass die erste SH3-Domäne einen deutlichen Einfluss auf die PDGF-Antwort hat (Abb.3.30D).

Die Expression von Nck2W148K ist ebenfalls nicht ausreichend, um das dorsale *ruffling* vollständig wie intaktes Nck2 zu rekonstituieren (Abb.3.30E). Die fehlende Funktion der dritten SH3-Domäne in NckW234K scheint allerdings keinen maßgeblichen Einfluss auf die Funktion von Nck im Hinblick auf die Ausbildung dorsaler *ruffles* zu haben (Abb.3.30F). Der Anteil der Zellen mit eben solchen *ruffles* beträgt 41% und ist damit ebenso groß, wie in #19-Zellen, die mit unverändertem Nck2 transfiziert wurden. Die Auswirkung der Mutation der zweiten und dritten SH3-Domäne in Nck2W148/234K entspricht mit einem Anteil dorsaler *ruffles* aufweisender Zellen von 19% dem Bild der Nck2W148K-exprimierenden Zellen (Abb.3.30G). Hierfür spielt die Mutation der dritten SH3-Domäne demzufolge keine Rolle. Graphische Darstellungen der zusammengefassten Ergebnisse dieses Experimentes finden sich in den Diagrammen 3.6 und 3.7. Resultate des Signifikanztests (t-Test) sind über Diagramm 3.6 dargestellt. Ein signifikanter Unterschied in der PDGF-Antwort der mit Nck2-Mutanten rekonstituierten Zellen gegenüber denen, die mit vollständig intaktem Nck2 rekonstituiert wurden, besteht bei $p \leq 0,05$. Es besteht bei dem gewählten Vertrauensintervall kein signifikanter Unterschied zwischen WT Nck2 und Nck2W148K, wohl aber zwischen WT Nck2 und Nck2W148/234K. Allerdings unterscheiden sich die Versuchsreihen Nck2W148K und Nck2W148/234K nicht voneinander. Der p-Wert von 0,062 für den t-Test von WT Nck2 und Nck2W148K ist hier vermutlich Resultat einer geringfügig zu hohen Standardabweichung der Reihe Nck2W148K.

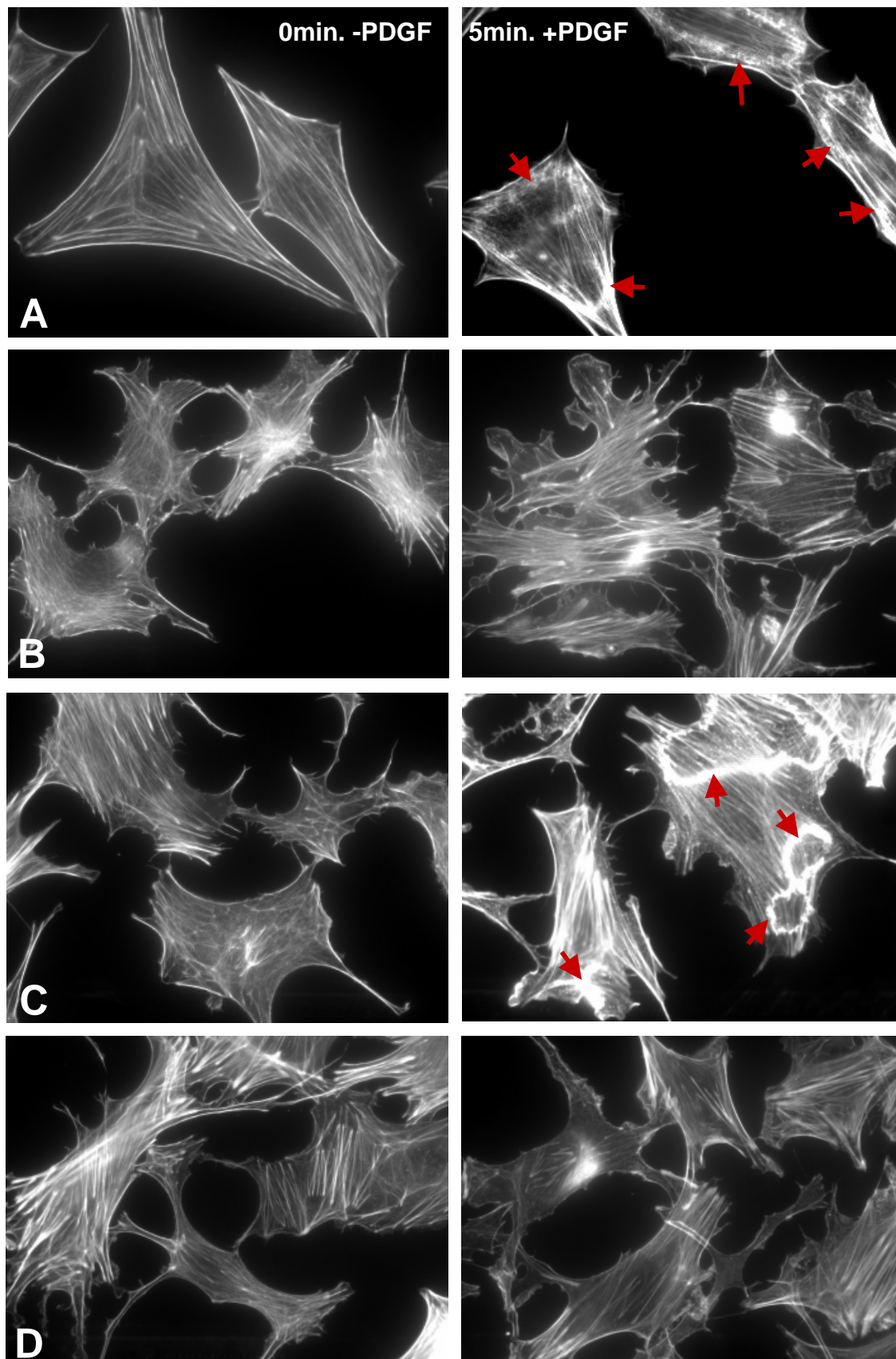


Abb3.30A-D: Nck-k.o. Zellen mit Nck-SH3-Mutanten rekonstituiert

Links sind die Kontrollzellen, rechts Zellen nach 5min. PDGF-Stimulation abgebildet. **A** zeigt #13-Zellen, die Vorläufer der Nck k.o.-Zellen. *Dorsales ruffling* nach PDGF-Stimulation ist sehr stark. In **B** sind die Nck k.o.-Zellen #19 zu sehen. Die PDGF-Antwort fehlt nahezu völlig. In **C** sind Nck2WT exprimierende #19 dargestellt. Das *dorsale ruffling* wurde effizient rekonstituiert. **D** zeigt #19-Zellen mit der Nck2W38K-Mutante. Es ist kaum noch *dorsales ruffling* sichtbar.

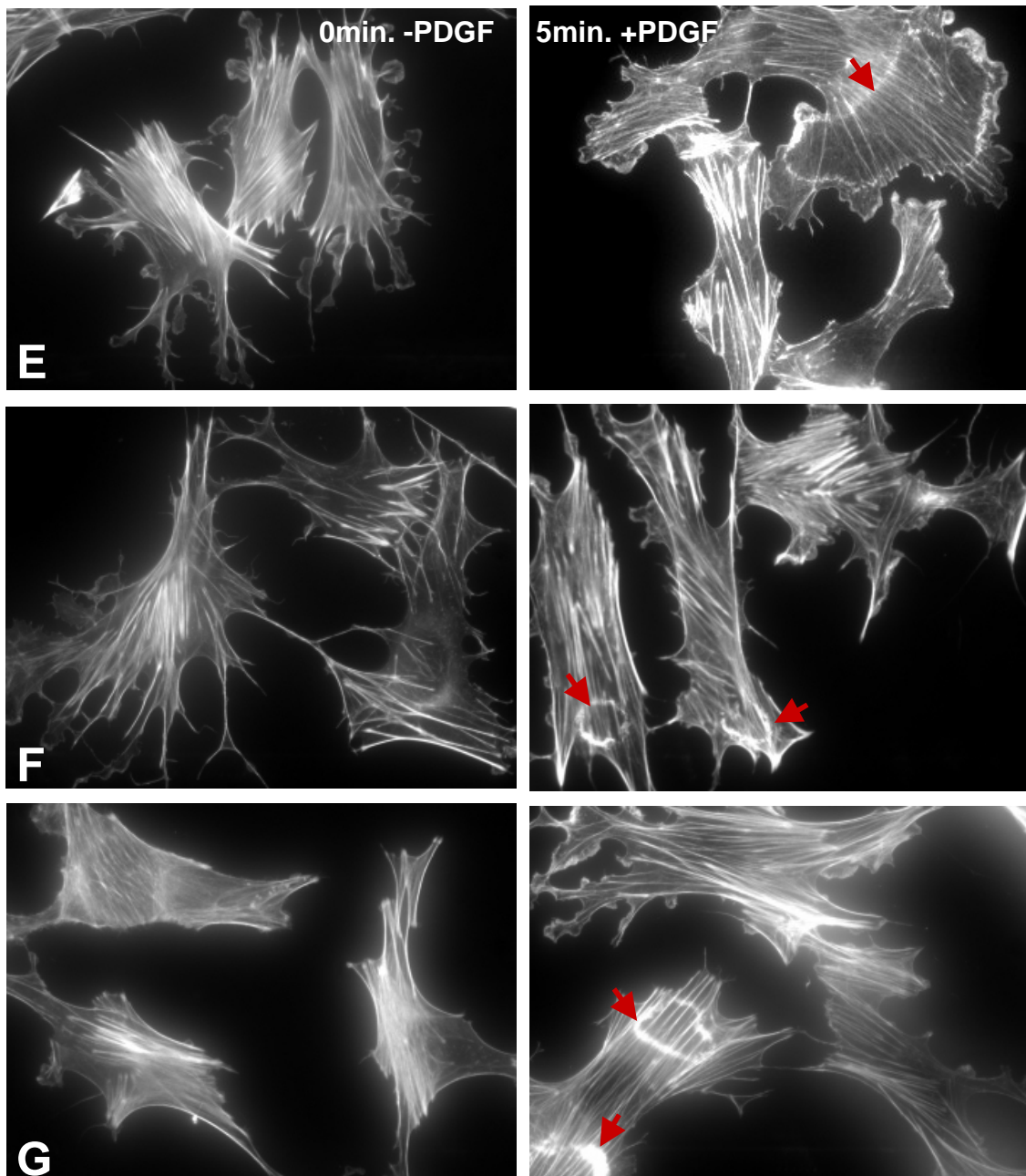


Abb3.30E-G: Nck-k.o. Zellen mit Nck-SH3-Mutanten rekonstituiert

Die Bilder **E** zeigen #19-Zellen mit Nck2W148K. Es ist *dorsales ruffling* zu beobachten, wenn auch in geringerem Maße als bei Nck2WT exprimierenden Zellen in **C**. In **F** sind Nck2W234K exprimierende #19-Zellen zu sehen. *Dorsales ruffling* erscheint gegenüber **C** nur geringfügig reduziert. **G** zeigt die Funktion der Doppelmutante Nck2W148/234K. Hier ist das *dorsale ruffling* in gleicher Weise beeinträchtigt wie in **E**.

Aus diesen Beobachtungen folgt, dass die erste SH3-Domäne von Nck nötig aber nicht ausreichend für die Signalübertragung von PDGF an das Aktinzytoskelett ist. Die zweite SH3-Domäne von Nck wird ebenfalls, wenn auch nicht in gleichem Maße, für eine Signalübertragung benötigt, während die dritte SH3-Domäne keinen Einfluss hat.

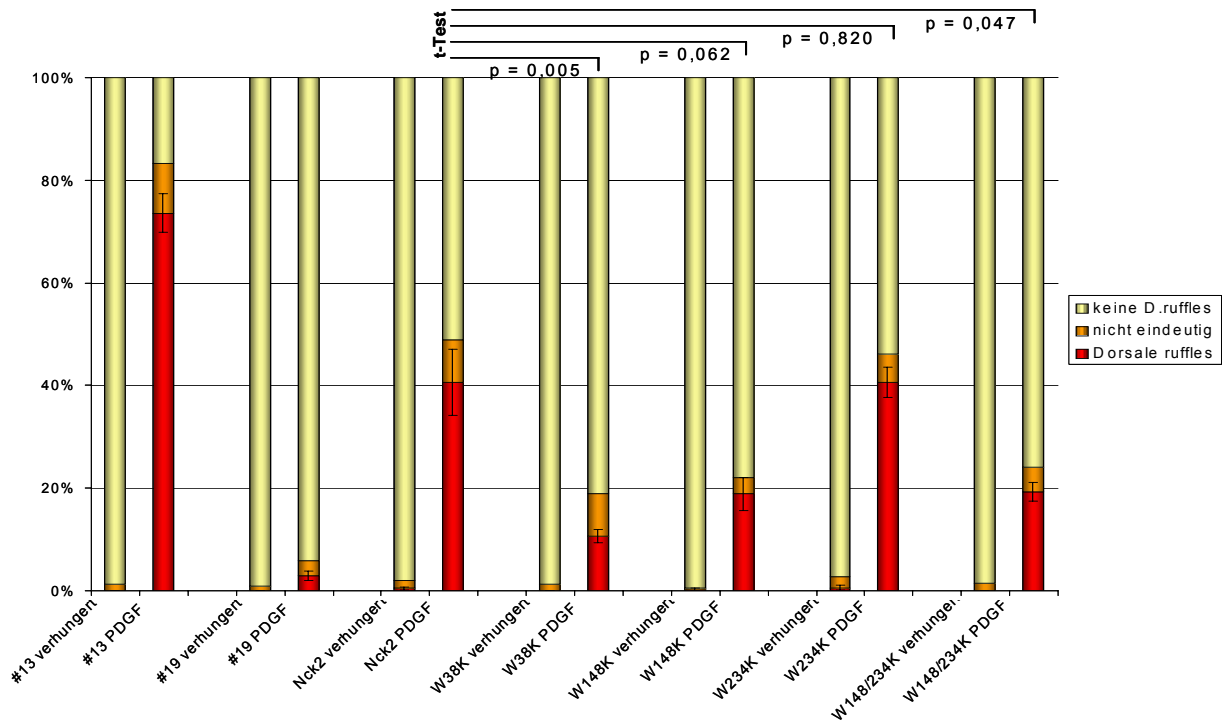


Diagramm 3.6: Dorsale Ruffles in PDGF-stimulierten Zellen. Das Diagramm zeigt das Verhältnis von Zellen mit Dorsalen Ruffles zu Zellen ohne Dorsale Ruffles in den jeweils angegebenen Zellen vor und nach Stimulation mit PDGF. Der Anteil der Zellen mit Dorsalen Ruffles ist in rot dargestellt, die Zellen ohne PDGF-Antwort in beige. Ein jeweils auftretender Anteil von Zellen mit nicht eindeutig erkennbarer PDGF-Antwort ist in orange dargestellt.

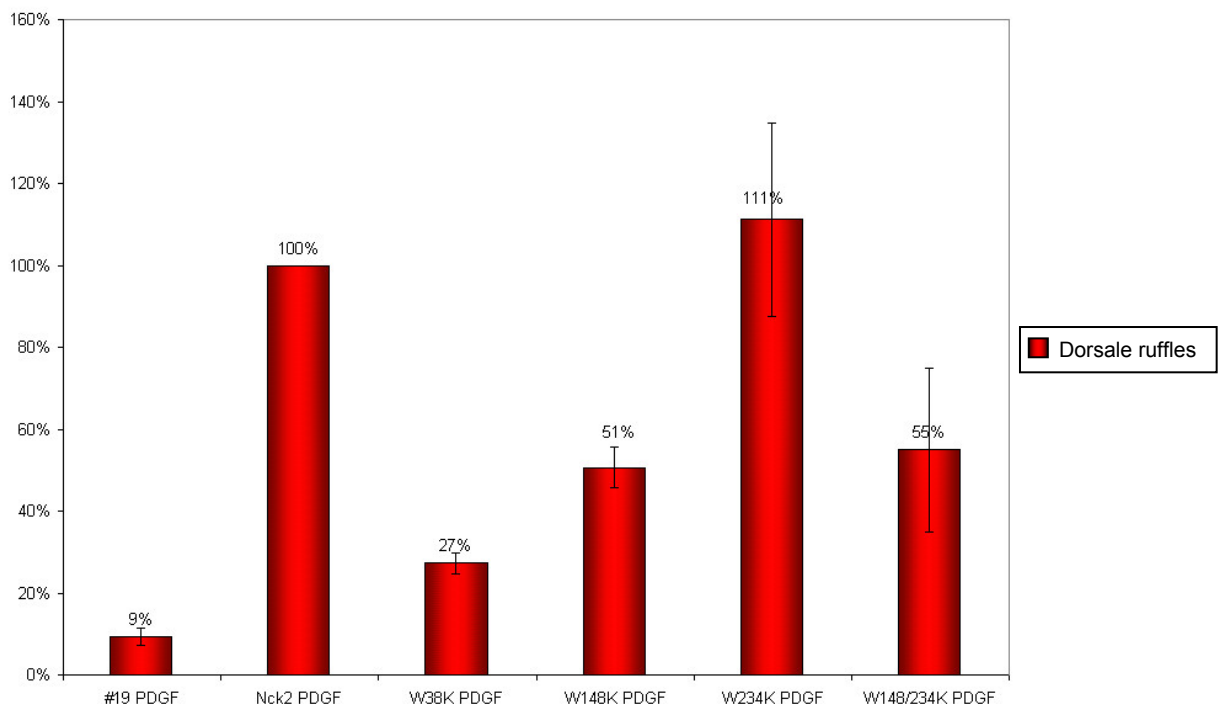


Diagramm 3.7: Dorsale Ruffles in PDGF-stimulierten Zellen bezogen auf Nck2-Rekonstitution. Gezeigt ist der jeweilige Anteil der Zellen mit PDGF-induzierten Dorsalen Ruffles im Bezug auf die mit WT Nck2 rekonstituierten Zellen. Bei den Zellen mit nicht veränderten Nck2 wird davon ausgegangen, dass unter den gewählten Bedingungen eine 100%-ige Wiederherstellung der PDGF-Antwort erfolgte. Daher wird deren Anteil an Zellen mit Dorsalen Ruffles hier als 100% angenommen und die PDGF-Antwort der Zellen mit Nck2-Mutanten auf diesen Wert bezogen. Auffällig ist die starke PDGF-Reaktion der W234K-Mutante (Δ SH3#3). 104

3.4 Herstellung eines konditionellen Abi1-k.o. in murinen ES-Zellen

Für die genauere Betrachtung der Nck/WAVE-Komplex-Interaktion und Überprüfung einer PDGF-vermittelten Signalgebung über Nck an den WAVE-Komplex sollte eine konditionelle Abi1-k.o. ES-Zelllinie hergestellt werden. Aus dieser könnte zum Einen eine Abi1-k.o. Fibroblastenlinie hergestellt werden und zum Anderen Mäuse mit konditionell ausgeschaltetem Abi1. Da ein konventioneller *knock-out* von Abi1 embryonal lethal ist, muss diese etwas aufwendigere Technik angewandt werden. Dabei werden die eng im Gen zusammenliegenden Exons 4 und 5 mit loxP-Sequenzen flankiert, die später in der lebenden Zelle bzw. dem lebenden Organismus über die Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden können. Ein Schema des targeting-Konstrukts ist in Abb.3.31 dargestellt.

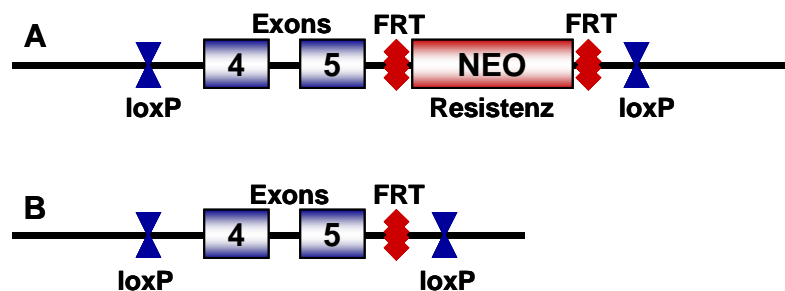


Abb.3.31: targeting-Konstrukt (schematisch)

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des *targeting*-Konstruktes vor (A) und nach Herausschneiden des Neomycin-Resistenzgens (B) durch die FLP-Rekombinase.

Als Ausgangszelllinie für die Herstellung einer homozygoten, konditionellen Abi1-k.o. Zelllinie stehen bereits murine ES-Zellen mit Abi1 +/flox zur Verfügung. Das erste *targeting* wurde erfolgreich durch Christian Erck durchgeführt. Die Neomycinresistenz wurde dabei bereits über die flankierenden FRT-Sequenzen entfernt (Abb.3.31 B).

Ein zweites *targeting* wurde zunächst mit dem ebenfalls zur Verfügung stehenden *targeting*-Konstrukt, wie in 2.8.9 beschrieben, durchgeführt. Nach Auswahl und Proliferation von 400 G418-selektierten Klonen wurde deren genomische DNA, wie in 2.6.6 angegeben, im Southern Blot analysiert. Zur Herstellung der Sonde wurden die Oligonucleotid-Primer von Christian Erck verwendet. Sie binden . Die ersten beiden *targeting*-Ansätze erzielten keinen homozygoten Abi1 flox/flox Klon. Die theoretische Wahrscheinlichkeit, dass ein solches zweites *targeting* einen homozygoten Klon zur Folge hat, beträgt 50%. Dies allerdings nur, wenn das *targeting*-Konstrukt nicht

unspezifisch in das Genom integriert wird. Um diese unspezifische Integration ins Genom zu vermeiden, sollte nun ein negativer Selektionsmarker in das *targeting*-Konstrukt eingefügt werden. Bei Integration an falscher Position bleibt das negative Selektionsmarker-Gen intakt. Die resultierende Thymidinkinase phosphoryliert dem Medium zugesetztes Ganciclovir, welches dann als Nukleosidanalogon während der Transkription zum Kettenabbruch führt. Die entsprechenden Zellen sollen durch die resultierende Stoffwechselbeeinträchtigung aus der Menge der positiv selektionierten Klone entfernt werden. Das nsm-Gen wurde über eine PCR aus dem Vektor *rapidflirt* amplifiziert und über XhoI und SalI Schnittstellen in das *targeting*-Konstrukt eingefügt.

Mit diesem modifizierten Konstrukt wurde ein weiteres *targeting* durchgeführt. Es wurden nach G418- sowie Gancyclovir-Selektion 300 Klone ausgewählt und wie zuvor über Southern Blot überprüft. In diesem Blot ist ein einzelner Klon zu sehen,

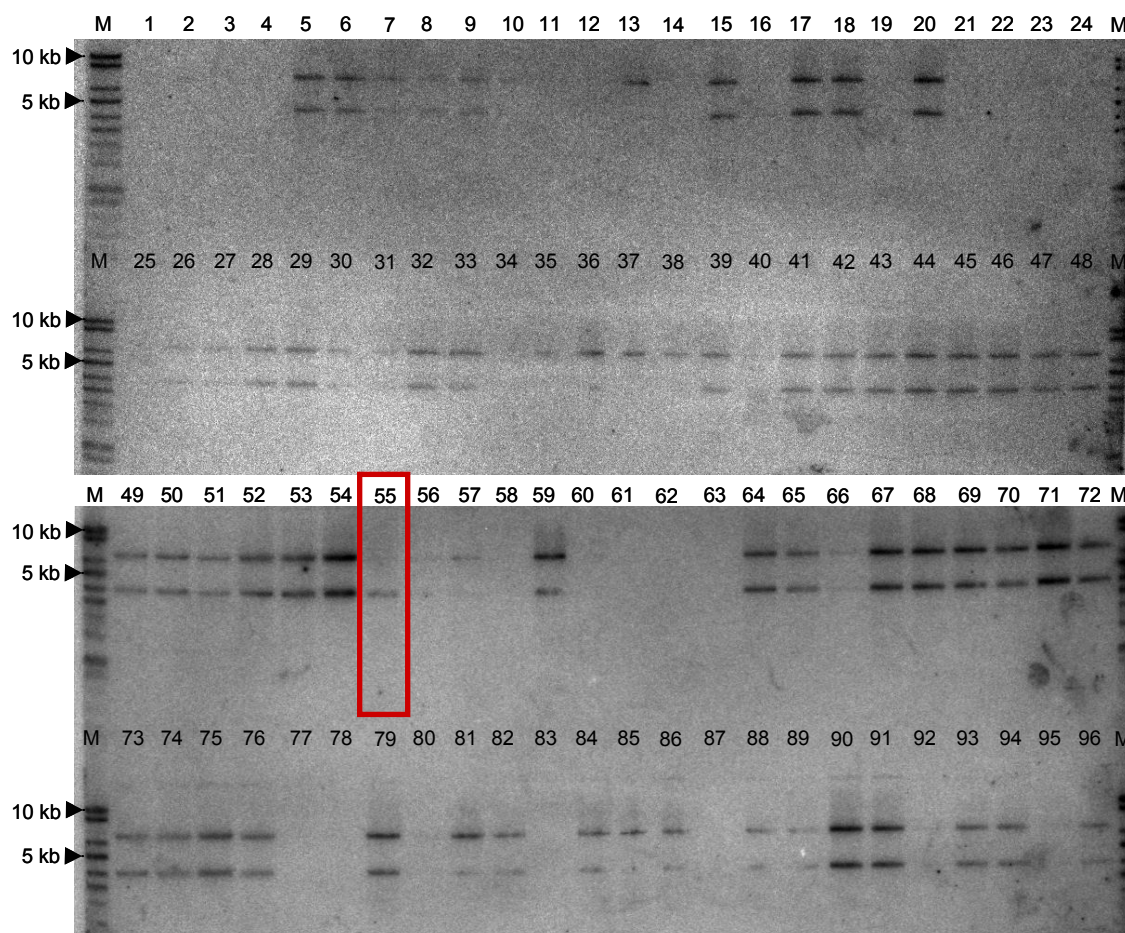


Abb.3.32: Southern Blot nach zweitem *targeting*

Dargestellt ist eine Southern Blot Membran mit genomischer DNA nach HindIII-Verdau aus einem zweiten ES-Zell *targeting*. Oberhalb von 5kb liegt die Wildtyp-Bande, unterhalb von 5kb findet sich das Sondenziel nach Einfügen einer weiteren HindIII-Schnittstelle durch das eingebrachte Konstrukt.

bei dem nur eine Bande, die kleinere, die im *targeting*-Konstrukt nach Einfügen der zusätzlichen HindIII-Schnittstelle entsteht, zu erkennen ist (Abb.3.32).

Zur Überprüfung dieses *targetings* wurde ein erneuter Blot durchgeführt, bei dem sich der potentiell positive Klon 55 als heterozygot herausstellte.

Zwischenzeitlich wurde durch Christian Erck mit den vorhandenen Abi1+/flox ES-Zellen weiter an einer Mauslinie gearbeitet. Es existierten bereits Chimären, bei deren Verpaarung unter Voraussetzung einer Keimbahntransmission der heterozygoten Abi1-flox-Zellen eine

heterozygote Mauslinie entstehen könnte.

Dieser Schritt würde ein zweites targeting überflüssig machen, da nach erneuter Verpaarung der heterozygoten Mäuse eine homozygote Maus erreicht werden

kann. Die erste Verpaarung der Chimären ergab 7 Nachkommen. Als einfache Kontrolle dieser Nachkommen wurden die Primer „abileft“ und „abiright“ (2.6.2) entworfen und die genomische DNA aus den Schwanzbiopsien einer PCR unterzogen. In Abb.3.33. ist zu erkennen,

dass keine der Mäuse das größere, gefloxt Abi1-Konstrukt enthält. Es kam also zu keiner Keimbahntransmission der heterozygoten Abi1+/flox Zellen.

An dieser Stelle wurde das Projekt eingestellt, zumal in einer Kooperation mit Leszek Kotula (New York Blood Center, USA) Abi1 k.o.-Zellen erhalten werden konnten.

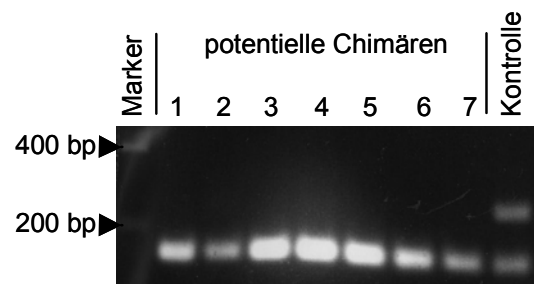


Abb.3.33: PCR zur Identifikation heterozygoter Abi1-k.o. Mäuse

Die Abbildung zeigt amplifizierte DNA der 7 potentiellen Chimären mit den Primern „abileft“ und „abiright“. Allen PCR-Produkten der untersuchten Mäuse fehlt die loxP-site, so dass nur die untere Wildtyp-Bande sichtbar ist (verglichen mit der Kontrolle).

4 Diskussion

4.1 Ena/VASP Proteine

Anhand der durchgeführten Versuche wurden mögliche Polyprolin-basierte Interaktionen zwischen den Ena/VASP-Proteinen und den Proteinen der WASP/Scar-Signalwege überprüft und dargestellt. Eine semiquantitative Auswertung der Western Blots erlaubt zudem Aussagen über die Intensität der jeweiligen Wechselwirkungen. Viele dieser Interaktionen sind vorraussichtlich in lebenden Zellen für Signaltransduktion von Bedeutung, einige wurden bereits beschrieben.

Ergebnisse, welche aus *in vitro* durchgeführten Versuchen abgeleitet wurden, wurden in der vorliegenden Arbeit mit anderen Methoden, soweit noch nicht geschehen, validiert und verfeinert. Isolierte SH3- oder EVH1-Domänen unterliegen zudem keiner weiteren Regulation durch den Rest des Proteins, wodurch Interaktionen erlaubt werden, die von den tatsächlichen Bindungseigenschaften abweichen. Desweiteren können durch die Überexpression der Zielproteine Bindungsgleichgewichte verschoben werden. Eine genauere Betrachtung der Rolle von Ena/VASP-Proteinen im Polyprolin-Interaktionsnetzwerk der hier angesprochene Adapter- und WASP/WAVE-Proteine wird Teil einer anderen Arbeit sein.

Zusammenfassend kann man zu Ena/VASP-Proteinen sagen, dass ihre Fähigkeit über die EVH1-Domänen an Abi1 zu binden schon beschrieben wurde (Tani et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit hat sich die starke Interaktion der EVH1-Domänen aller Mitglieder dieser Familie mit Abi1 bestätigt. Zudem zeigte sich eine Interaktion der EVH1-Domäne von Mena mit WAVE1 und etwas schwächer mit WAVE2. Diese Interaktion kann aber die Rekrutierung von Ena/VASP-Proteinen an die lamellipodiale Spitze nicht erklären, da sie für EVL nur gering und für das ubiquitäre VASP gar nicht beobachtet wurde. Ena/VASP-Proteine lokalisieren aber alle gleichermassen stark im Lamellipodium, wofür die intakte EVH1-Domäne essentiell ist (Rottner et al., 1999). Somit ist die lamellipodiale Lokalisation von VASP mit allerhöchster Wahrscheinlichkeit auf die Interaktion mit Abi zurückzuführen, da Abi1 ein Teil des WAVE-Komplexes ist (Innocenti et al., 2004). Die hier ebenfalls ausgeprägte Interaktion der EVH1-Domänen von Mena und EVL mit dem hämatopoetischen WASP wurde zuvor ebenfalls beschrieben (Castellano et al.,

2001). Allerdings ist die Funktion dieser Interaktion noch nicht eindeutig geklärt. Eine Beteiligung an der Aktivierung von WASP, z.B. in der immunologischen Synapse oder in Podosomen wird diskutiert (Krause et al., 2000; Mykkänen et al., 2001).

Die Interaktionen der verschiedenen getesteten SH3-Domänen mit Mena und VASP bestätigen darüber hinaus die Komplexität des vorliegenden Interaktionsnetzwerkes: IRSp53 bindet mit seiner SH3 Domäne an Ena/VASP-Proteine (hier Mena und VASP). Durch die von Ena/VASP-Proteinen unabhängige Lokalisation von IRSp53 an der lamellipodialen Spitze (Nakagawa et al., 2003) lässt sich rückschließen, dass die an anderer Stelle beschriebene Interaktion mit WAVE2 (Miki et al., 1999) für diese Eigenschaft von IRSp53 von größerer Bedeutung ist. Die Interaktion von Mena und IRSp53 wurde an anderer Stelle auch eher einer Funktion bei der Filopodienbildung zugeordnet (Krugmann et al., 2001). Neuere Daten über die Rolle von IRSp53 bei der Filopodienbildung zeigen, dass in jedem Falle die Interaktion von IRSp53 mit dem SH3-Adapter Eps8 hier von Bedeutung ist (Disanza et al., 2006). Ob sich diese Bindungen ergänzen oder ob sie miteinander kompetitieren, ist noch unklar. Beide Arbeiten (Krugmann et al., 2001; Disanza et al., 2006) haben aber gezeigt, dass IRSp53 autoinhibiert ist und durch Interaktionen, die seine SH3-Domäne ansprechen (triggern) aktiviert wird.

Eine zusätzliche Aktivierung von IRSp53 durch Bindung an aktive Rho-GTPasen scheint die Auflösung der Autoinhibition und die Bindung an verschiedene Effektoren weiter zu verstärken bzw. zu spezifizieren (Krugman et al., 2001; Fujiwara et al., 2000). Während die Bindung von Cdc42 mit der Rolle von IRSp53 in Filopodien in Verbindung gebracht wurde (Krugmann et al., 2001), wurde die Bindung an Rac mit der Aktivierung von WAVE (Miki et al., 1999) bzw. des WAVE-Komplexes (Miki und Takenawa, 2002; Suetsugu et al., 2006) in Zusammenhang gebracht, und die Bindung an Rho ging mit der Bindung und Aktivierung des Rho-Effektors mDia1 einher (Fujiwara et al., 2000). Die Rolle von IRSp53 bleibt also weiterhin komplex. Zum besseren Verständnis der Bedeutung seiner Interaktionen für Zellprotrusionen wie Lamellipodien und Filopodien sind daher zusätzliche Studien notwendig.

In den durchgeführten Experimenten war die deutliche Interaktion der ersten SH3-Domänen von Nck1 und besonders Nck2 mit sowohl Mena als auch mit VASP auffällig. Über die Bedeutung dieser bislang nicht beschriebenen Interaktionen lassen sich zu diesem Zeitpunkt allerdings nur sehr vorläufige Aussagen treffen. Klar

ist, dass die erste SH3-Domäne von Nck diejenige Interaktionsoberfläche ist, mit der Substrate für Serin/Threonin Kinasen wie PAK und PKN rekrutiert werden können. Beide genannten Kinasen binden an Nck über die zweite SH3-Domäne und werden von Rac-und/oder Cdc42 Signalen – die ja Lamellipodien und Filopodien induzieren – aktiviert. Eine S/T-Phosphorylierung von Ena/VASP-Proteinen ist bekannt und geht mit deren Aktivität einher (Geese et al., 2002; Loureiro et al., 2002; vergleiche auch 4.2).

In anderen Studien wird insbesondere die Funktion der Ena/VASP-Proteine in der Filopodienbildung hervorgehoben. Nach Bear et al. (2002) binden Ena/VASP-Proteine in Filopodien an Plus-Enden der Filopodien, blockieren sie so gegenüber *capping*-Proteinen und erlauben so eine größere Elongation. Neuere Erkenntnisse legen hier eine Kooperation von Ena/VASP-Proteinen und einem Typ von Aktinpolymerasen, den Forminen, in der Filopodienbildung nahe (Schirenbeck et al., 2005). Ein Ena/VASP triple-knockout von Ena/VASP-Proteinen in der Maus zeigt, dass diese zwar zur effizienten Ausbildung von Filopodien in Neuronen nötig, aber für die Filopodienbildung an sich nicht essentiell sind (Dent et al., 2007). Im Schleimpilz *Dictyostelium* hingegen sind Ena/VASP Proteine essentiell für Filopodien (Han et al., 2002), somit ist die Situation im Säuger möglicherweise durch die Anwesenheit anderer Proteine mit ähnlichen Aktivitäten kompliziert. Ein Unterschied ist z.B., dass *Dictyostelium* kein Ortholog für IRSp53 oder Eps8 besitzt.

Das Adapterprotein Eps8 interagiert selbst nicht mit Ena/VASP Proteinen, weder über seine SH3-Domäne (Abb. 3.4) noch über seine Prolin-reiche Domäne an die EVH1 Domäne (Abb. 3.2). Nichtsdestotrotz spielt es eine wichtige Rolle in diesem Interaktionsnetzwerk, da es ein prominenter Interaktionspartner sowohl von Abi als auch von Eps8 ist. Eps8 vereint drei bekannte Aktivitäten in seiner C-terminalen Effektdomäne, die Aktivierung von SOS zum Nukleotidaustauschfaktor für Rac1 (Scita et al., 1999), eine Aktin-Capping-Funktion, die im Zusammenhang mit der Bindung an Abi1 sichtbar wird (Disanza et al., 2004), und eine Aktin-Bündelungsaktivität, die im Komplex mit IRSp53 eine Rolle spielt (Disanza et al., 2006) (vergl auch Kapitel1). Eps8 lokalisiert hauptsächlich an der lamellipodialen Spitze, eine Eigenschaft, die auf seine SH3-Domäne zurückgeführt werden kann. Diese ist für die Interaktion mit Abi essentiell, aber nicht für die mit IRSp53. Man kann also rückschließen, dass Eps8 im Lamellipodium an Abi bindet und als Capping-Protein wirkt. Dazu passen die Ergebnisse, die die Interaktion von Eps8 und IRSp53

mit Aktinbündelung und Filopodienbildung in Zusammenhang bringen. Für diese Interaktion ist die SH3-Domäne von IRSp53 essentiell (Disanza et al., 2006). Ob die endogenen Komplexe Abi/Eps8 und IRSp53/Eps8 auch an Ena/VASP Proteine binden oder exklusiv sind, bleibt offen.

4.2 Biochemische Betrachtung der Interaktion von Nck mit dem WAVE-Komplex

Die Bedeutung des Arp2/3-Komplexes für die Aktin-abhängige Zellmotilität wurde in der Einleitung eingehend erläutert. Ebenso wurde die WASP- und WAVE-Proteinfamilie als Arp2/3-Aktivatoren vorgestellt. Während aber auf der einen Seite die Regulation von WASP und N-WASP durch Autoinhibition schon weitgehend geklärt ist, weiß man nur wenig über die Kontrollmechanismen des WAVE-Komplexes. Zwar steht fest, dass die Proteine Nap1, Sra1 und Abi1 zusammen mit WAVE den WAVE-Komplex bilden, der für die biologische Aktivität der Lamellipodienbildung benötigt wird (Steffen et al., 2004), aber wie die verantwortlichen Signalwege im Detail aussehen, mit denen WAVE innerhalb dieses Komplexes oder mit denen der gesamte Komplex reguliert wird, ist nicht bekannt.

Die in dieser Arbeit beschriebene Interaktion der ersten SH3-Domäne von Nck mit dem WAVE-Komplex bietet einen Hinweis auf eine mögliche Regulation. Nck bietet mit seinen 4 Adapterdomänen zahlreiche Möglichkeiten, Interaktionspartner untereinander zu verbinden und so Signale zu integrieren. Ein prominentes Beispiel hierfür wäre die Rekrutierung von N-WASP an phosphoryliertes Tir nach Infektion der Zelle mit *Enteropathogenen E.coli*. Daraus ergibt sich die Frage nach den Effektoren, die für eine Regulation des WAVE-Komplex in Frage kämen. Eine gut beschriebene Funktion von Nck ist es, über seine SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosine in Rezeptortyrosinkinasen, z.B. dem PDGF-Rezeptor, zu binden. Die Bindung der C-terminalen SH2-Domäne geht, wie schon vorher diskutiert, mit einer Rekrutierung von WIP/N-WASP über die SH3s #2 und #3 einher, was wahrscheinlich mit der Endozytose des Rezeptors in Zusammenhang steht (Benesch et al., 2005, Innocenti et al., 2005). Ob eine Beteiligung der ersten SH3-Domäne hier eine Rolle spielt, bzw. ob der WAVE-Komplex gebunden werden kann, ist nicht formal ausgeschlossen, konnte aber bisher nicht beobachtet werden. Eine Interaktion zwischen Nck und dem

WAVE-Komplex ist jedoch unbestritten und kann auch in dieser Arbeit dargestellt werden. Ein weiteres Indiz für die biologische Funktion der Nck-WAVE-Komplex-Interaktion ist die Abwesenheit von Nck an der lamellipodialen Spitze, wo der WAVE-Komplex aktiv ist. Daraus kann man schließen, dass Nck mit dem inaktiven WAVE-Komplex interagiert. Ob diese Interaktion aber der Inhibition gilt oder der Aktivierung vorausgeht, bzw. sie bedingt, ist offen. Die vorliegenden Experimente legen allerdings die zweite Variante nahe, bei der Nck als klassischer Adapter nach Rac-Aktivierung Serin/Threonin Kinasen wie PAK an den WAVE-Komplex bringt, welche diesen dann (prä)aktivieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zuerst die bevorzugten Bindungsmotive von allen hier untersuchten SH3-Adaptoren an WAVE und Abi untersucht. Die durchgeführten Peptid Scans mit SH3-Domänen von Nck1/2, Eps8, Abi1 und IRSp53 bestätigen im wesentlichen die bereits beschriebenen Bindungsmotive von Eps8 (Mongiovi et al., 1999) sowie der zweiten SH3-Domänen von Nck1/2 und der dritten SH3-Domäne von Nck1 (vergl. auch Doktorarbeit Anke Fabian, 2006). Das Erkennungsmotiv von Abi1 in der Prolin-reichen Region von N-WASP sowie das der ersten SH3-Domänen von Nck1/2 in WAVE2 und Abi1 gehören zu den neu gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit.

Bei einem Vergleich der Konsensus-Motive der verwendeten SH3-Domänen fällt auf, dass es hier lediglich 2 unterschiedliche Populationen gibt. Die Domänen, die an N-WASP binden – Nck1/2 SH3#2, Nck1 SH3#3 und Abi1 SH3 – bevorzugen die Bindungssequenz P₅XR, damit also eine basisch flankierte Polyprolin-Sequenz. Der SH3-Domäne von Eps8 und den ersten SH3-Domänen von Nck1 und Nck2 ist mit P₆XXDY eine Bindungssequenz gemein, die von Aminosäuren mit saurer und hydrophober Seitenkette flankiert wird. Mit besonderem Augenmerk auf Nck 1 und 2 ist ein derartig gegensätzliches Bindungsverhalten der einzelnen Domänen interessant.

Die GST-Pulldowns und Immunpräzipitationen mit Volllängenproteinen bestätigen die vorher erhobenen Daten. Bei Immunpräzipitationen, die weniger anfällig für Artefakte sind, ist allerdings auffällig, dass es zwar eine deutliche Interaktion von endogenem WAVE mit GFP-fusioniertem Nck gibt, aber nur eine schwach nachweisbare Interaktionen zwischen endogenem Nck mit WAVE bzw. GFP-WAVE. Es wäre

denkbar, dass die Fusion mit GFP Nck strukturell verändert und eventuelle Regulationsmechanismen zugunsten der Nck/WAVE-Interaktion ausschaltet. Es spricht einiges dafür, dass Nck z.B. über Autoinhibition (wie auch IRSp53 oder Eps8) reguliert ist. Es interagiert nicht konstitutiv sondern signalabhängig bei der Endozytose mit WIP/N-WASP. Auch die WAVE-Komplex-Interaktion ist klarerweise nicht konstitutiv (siehe auch oben). Eine Fusion an GFP, welches selbst 2/3 der Größe von Nck hat, könnte also sterische Konstriktionen verändern oder aufheben.

In den Immunpräzipitationen mit Nck-Mutanten wurde erneut die ausschließliche Notwendigkeit der ersten SH3-Domäne von Nck zur Bindung des WAVE-Komplexes nachgewiesen. In diesen Versuchen zeigte sich ein Trend, der auf eine stärkere Nck/WAVE-Komplex-Interaktion unter Anwesenheit einer defekten zweiten und/oder dritten SH3-Domäne von Nck hindeutete. Dies legt eine Verschiebung des Bindungsverhältnisses zugunsten dieser Interaktion aufgrund fehlender Bindungspartner an zweiter und dritter SH3-Domäne hin. Im Gegensatz dazu steht die beschriebene Interaktion von Nck mit aktivem WIP/N-WASP, welche die Funktionalität aller 3 SH3-Domänen für volle Aktivierung, aber mindestens der Zweiten und Dritten voraussetzt (Rohatgi et al., 2001).

Ein weiterer Unterschied der Nck/WAVE-Komplex-Interaktion gegenüber der Nck/N-WASP-Interaktion ist der Aktivierungszustand der Zelle (vergl. auch oben). Nach PDGF-Stimulation zeigt sich in dieser Arbeit eine schwächere Kopräzipitation von Nck mit WAVE als in verhungerten Zellen, d.h. von inaktivem WAVE, da verhungerte Zellen keine Lamellipodien haben. Da, wie bereits dargestellt, Nck nicht mit aktivem WAVE kolokalisiert und WAVE außerdem nicht an den aktivierten Rezeptoren zu finden ist, an die Nck über seine SH2-Domäne rekrutiert wird, kann man schließen, dass die WAVE-Aktivität vom Nck-SH2-Domänen-Engagement unabhängig ist. In stimulierten Zellen ist die Nck/WAVE-Komplex-Interaktion gegenüber den verhungerten Zellen jedenfalls merklich reduziert. Ob Nck in stimulierten Zellen weniger an WAVE bindet, weil es an anderer Stelle über seine SH2-Domänen in alternative Komplexe engagiert wird, oder ob seine Affinität für den aktiven WAVE-Komplex per se reduziert ist – z.B. durch Phosphorylierung der Prolin-reichen Regionen –, bleibt offen.

Für ein phosphorylierungsabhängiges Bindungsverhalten von Nck gegenüber dem WAVE-Komplex spricht auch die deutlich reduzierte Antwort auf PDGF-Stimulation von Nck-k.o.-Zellen, bzw Nck k.o. Zellen die mit der Mutante Nck2W38K rekonstituiert wurden. Ein Zusammenhang zwischen der Interaktion der ersten – in diesem Experiment defekten – SH3-Domäne von Nck mit dem WAVE-Komplex und dem Ausbleiben einer unter anderem durch WAVE regulierten Struktur (Suetsugu et al., 2003) kann hier also direkt beobachtet werden. Die ebenfalls reduzierte PDGF-Antwort in Zellen, die mit Nck ohne funktionstüchtige zweite SH3-Domäne rekonstituiert wurden, zeigt, dass noch eine weitere Interaktion von Nck mit der WAVE-Komplex abhängigen Bildung von dorsalen Ruffles zusammenhängt. Die zweite SH3-Domäne von Nck ist, neben der Bindung an WIP, welches konstitutiv an N-WASP bindet und daher hier nicht in Frage kommt, für dessen Bindung mit PAK1 verantwortlich (Galisteo et al., 1996). Diese Beobachtung kann erklärt werden, wenn man davon ausgeht, dass die Aktivität von WAVE durch die gezeigte Phosphorylierung nach PDGF-Stimulation (Miki et al., 1999) beeinflusst wird und dass PAK1 tatsächlich für diese Phosphorylierung verantwortlich sein könnte. Ein weiterer unbestimmter Zusammenhang wurde hergestellt, als Guo und Kollegen (2006) beobachteten, dass eine Überexpression von PAK in Rac1 knock-out Zellen, die keine Lamellipodien haben, zu einer teilweisen Rekonstitution führt. Die Autoren haben daraus geschlossen, dass die zytoskeletalen Defekte in Abwesenheit von Rac1 ‚downstream‘ von Pak zu suchen sind. Ein weiterer Zusammenhang zwischen WAVE und PAK wird in einer neueren Arbeit vorgeschlagen (Takahashi & Suzuki, 2009). Dort wird von einer direkten Bindung von PAK1 an WAVE ausgegangen und ein direkter Zusammenhang dieser Interaktion mit Kinesin-abhängigem Transport von WAVE an die lamellipodiale Spitze hergestellt.

5 Ausblick

Wie bereits in Kapitel 4 diskutiert, sind die biologischen Konsequenzen der Bindung zwischen Nck-Proteinen und dem WAVE-Komplex bislang nicht geklärt. Die Regulation des WAVE-Komplexes ist (unter anderem) abhängig von der kleinen GTPase Rac. In diesem Zusammenhang ist mit den Erkenntnissen dieser Arbeit insbesondere die Rolle der PAK-Proteinfamilie interessant. Sowohl die Serin/Threonin-Kinasen der PAK-Familie als auch die strukturell und funktionell verwandten PKNs sind Effektoren von Rac und binden sowohl an Nck als auch an Rac. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führt sowohl ein Defekt in der ersten, WAVE-Komplexbindenden, SH3-Domäne als auch ein Defekt der zweiten, PAK-bindenden, SH3-Domäne von Nck zu deutlich erkennbaren Störungen in der Bildung WAVE-abhängiger Aktinstrukturen. Die Untersuchung einer Abhängigkeit der WAVE-Komplexaktivität von diesen Ser/Thr-Kinasen könnte das Ziel folgender Arbeiten sein.

Interaktionsstudien mit Vertretern der PAKs bzw. PKNs und Nck oder dem WAVE-Komplex würden Erkenntnisse über die Bindungsverhältnisse liefern.

Über RNAi gegen spezifische PAKs und PKNs könnten die Expressionslevel der jeweiligen Kinase reduziert werden. Dieser Ansatz wird jedoch dadurch erschwert, dass deren genaues Expressionprofil in einer gegebenen Zelllinie erst erhoben werden muss, um festzulegen, welche RNAs genau mit RNA-Interferenz blockiert werden müssen. Die Beobachtung von WAVE-Komplexabhängigen Aktinstrukturen wie Lamellipodien oder der in dieser Arbeit behandelten dorsalen Ruffles würde bei erfolgreicher RNA-Interferenz zeigen, ob und in welchem Umfang das jeweilige PAK bzw. PKN für die WAVE-Komplexaktivierung relevant ist. Eine weitere Möglichkeit die PAK-Aktivität in Zellen zu reduzieren, ist die Überexpression der Autoinhibitorischen Region von PAK (PAK inhibitory domain, PID). Somit kann die PAK-Aktivität reduziert und ggf. eine Veränderung der WAVE-abhängigen Strukturen beobachtet werden. Diese Experimente werden gerade durchgeführt, und sind entsprechend nicht in die vorliegende Arbeit aufgenommen.

Ein weiterer möglicher Ansatz, den Einfluss von PAK oder PKN auf die WAVE-Komplexaktivität direkt darzustellen, wären *in vitro* Experimente mit aufgereinigtem WAVE-Komplex. In Derivery et al. (2009) wurde ein Verfahren zur Aufreinigung funktionellen WAVE-Komplexes beschrieben. Ein ähnlicher Versuchsansatz wäre

auch für die o.g. Problemstellung denkbar. In in vitro Aktinpolymerisations-Assays würde die Zugabe der aktiven Kinase-Domäne von PKN oder PAK entsprechend eine Aktivierung des sonst inaktiven Komplexes verursachen. Ein Fernziel wäre die komplette Rekonstitution des aktivierenden Signalweges in vitro. Ein Hinweis darauf, dass diese Ansätze erfolgversprechend sind, ist die Beschreibung einer Teilrekonstitution von lamellipodienartigen Strukturen in Rac1-knockout-Zellen nach Überexpression von PAK (Guo et al., 2006).

Es sind also noch etliche Fragen offen, die mit verschiedenen zellbiologischen und biochemischen Ansätzen beantwortet werden müssen, um die Regulation des WAVE-Komplexes zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

Abercrombie M., Heaysman J.E., Pegrum S.M.: The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res.* 1970 Mar; **59** (3):393-8.

Ahern-Djamali S.M., Bachmann C., Hua P., Reddy S.K., Kastenmeier A.S., Walter U., Hoffmann F.M.: Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for Drosophila enabled. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 27; **96** (9):4977-82.

Amann K.J., Pollard T.D.: The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol.* 2001 Mar; **3** (3):306-10.

Andrae J, Gallini R, Betsholtz C.: Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008 May 15; **22**(10):1276-312. Review.

Anton I.M., Lu W., Mayer B.J., Ramesh N., Geha R.S.: The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck. *J Biol Chem.* 1998 Aug 14; **273** (33):20992-5.

Bachmann C., Fischer L., Walter U., Reinhard M.: The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem.* 1999 Aug 13; **274** (33):23549-57.

Bailly M., Ichetovkin I., Grant W., Zebda N., Machesky LM., Segall JE., Condeelis J.: The F-actin side binding activity of the Arp2/3 complex is essential for actin nucleation and lamellipod extension. *Curr Biol.* 2001 Apr 17; **11** (8):620-5.

Bear J.E., Rawls J.F., Saxe C.L. 3rd.: SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J Cell Biol.* 1998 Sep 7; **142** (5):1325-35.

Bear J.E., Loureiro J.J., Libova I., Fässler R., Wehland J., Gertler F.B.: Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell.* 2000 Jun 23; **101** (7):717-28.

Bear J.E., Svitkina T.M., Krause M., Schafer D.A., Loureiro J.J., Strasser G.A., Maly I.V., Chaga O.Y., Cooper J.A., Borisy G.G., Gertler F.B.: Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell.* 2002 May 17; **109** (4):509-21.

Benesch S., Polo S., Lai F.P., Anderson K.I., Stradal T.E., Wehland J., Rottner K.: N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci.* 2005 Jul 15; **118** (Pt 14):3103-15.

Bergsten E., Uutela M., Li X., Pietras K., Ostman A., Heldin C.H., Alitalo K., Eriksson U.: PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol.* 2001 May; **3** (5):512-6.

Beutling U., Stading K., Stradal T., Frank R.: Large-scale analysis of protein-protein interactions using cellulose-bound peptide arrays. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008; **110** :115-52. Review.

Bladt F., Aippersbach E., Gelkop S., Strasser G.A., Nash P., Tafuri A., Gertler F.B., Pawson T.: The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol Cell Biol.* 2003 Jul; **23** (13):4586-97.

Bompard G., Caron E.: Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol.* 2004 Sep 27; **166** (7):957-62. Review.

Boquet I., Boujemaa R., Carlier M.F., Preat T.: Ciboulot regulates actin assembly during *Drosophila* brain metamorphosis. *Cell.* 2000 Sep 15; **102** (6):797-808.

Braverman L.E., Quilliam L.A.: Identification of Grb4/Nckbeta, a src homology 2 and 3 domain-containing adapter protein having similar binding and biological properties to Nck. *J Biol Chem.* 1999 Feb 26; **274** (9):5542-9.

Breitsprecher D., Kieseewetter A.K., Linkner J., Urbanke C., Resch G.P., Small J.V., Faix J.: Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J.* 2008 Nov 19; **27** (22):2943-54.

Brindle N.P., Holt M.R., Davies J.E., Price C.J., Critchley D.R.: The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem J.* 1996 Sep 15; **318** (Pt 3):753-7.

Carl U.D., Pollmann M., Orr E., Gertler F.B., Chakraborty T., Wehland J.: Aromatic and basic residues within the EVH1 domain of VASP specify its interaction with proline-rich ligands. *Curr Biol.* 1999 Jul 1; **9** (13):715-8.

Castellano F., Le Clainche C., Patin D., Carlier M.F., Chavrier P.: A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *EMBO J.* 2001 Oct 15; **20** (20):5603-14.

Cesareni G., Panni S., Nardelli G., Castagnoli L.: Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains? *FEBS Lett.* 2002 Feb 20; **513** (1):38-44.

Cestra G., Castagnoli L., Dente L., Minenkova O., Petrelli A., Migone N., Hoffmuller U., Schneider-Mergener J., Cesareni G.: The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5; **274** (45):32001-7.

Chardin P., Camonis J.H., Gale N.W., van Aelst L., Schlessinger J., Wigler M.H., Bar-Sagi D.: Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science.* 1993 May 28; **260** (5112):1338-43.

Chen M., She H., Davis E.M., Spicer C.M., Kim L., Ren R., Le Beau M.M., Li W.: Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity. *J Biol Chem.* 1998 Sep 25; **273** (39):25171-8.

Chi S., Chang S., Park D.: Pak regulates calpain-dependent degradation of E3b1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jun 25; **319** (2):683-9.

Claesson-Welsh L., Hammacher A., Westermark B., Heldin C.H., Nistér M.: Identification and structural analysis of the A type receptor for platelet-derived growth factor. Similarities with the B type receptor. *J Biol Chem.* 1989 Jan 25; **264** (3):1742-7.

Cooper J.A.: Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol.* 1987 Oct; **105** (4):1473-8. Review.

Courtney K.D., Grove M., Vandongen H., Vandongen A., LaMantia A.S., Pendergast A.M.: Localization and phosphorylation of Abl-interactor proteins, Abi-1 and Abi-2, in the developing nervous system. *Mol Cell Neurosci.* 2000 Sep; **16** (3):244-57.

Coutinho S., Jahn T., Lewitzky M., Feller S., Hutzler P., Peschel C., Duyster J.: Characterization of Ggrb4, an adapter protein interacting with Bcr-Abl. *Blood.* 2000 Jul 15; **96** (2):618-24.

Dai Z., Pendergast A.M.: Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev.* 1995 Nov 1; **9** (21):2569-82.

Dent E.W., Kwiatkowski A.V., Mebane L.M., Philippar U., Barzik M., Robinson D.A., Gupton S., Van Veen J.E., Furman C., Zhang J., Alberts A.S., Mori S., Gertler F.B.: Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol.* 2007 Dec; **9** (12):1347-59.

Derivery E., Lombard B., Loew D., Gautreau A.: The Wave complex is intrinsically inactive. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2009 Feb 10. [Epub ahead of print]

Di Fiore P.P., Scita G.: Eps8 in the midst of GTPases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Oct; **34** (10):1178-83.

Disanza A., Carlier M.F., Stradal T.E., Didry D., Frittoli E., Confalonieri S., Croce A., Wehland J., Di Fiore P.P., Scita G.: Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments. *Nat Cell Biol.* 2004 Dec; **6** (12):1180-8.

Disanza A., Mantoani S., Hertzog M., Gerboth S., Frittoli E., Steffen A., Berhoerster K., Kreienkamp H.J., Milanesi F., Di Fiore P.P., Ciliberto A., Stradal T.E., Scita G.: Regulation of cell shape by Cdc42 is mediated by the synergic actin-bundling activity of the Eps8-IRSp53 complex. *Nat Cell Biol.* 2006 Dec; **8** (12):1337-47.

Drees B., Friederich E., Fradelizi J., Louvard D., Beckerle M.C., Golsteyn R.M.: Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins. *J Biol Chem.* 2000 Jul 21; **275** (29):22503-11.

Eden S., Rohatgi R., Podtelejnikov A.V., Mann M., Kirschner M.W.: Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature.* 2002 Aug 15; **418** (6899):790-3.

Ekman S., Thuresson E.R., Heldin C.H., Rönstrand L.: Increased mitogenicity of an alphabeta heterodimeric PDGF receptor complex correlates with lack of RasGAP binding. *Oncogene.* 1999 Apr 15; **18** (15):2481-8.

Fan P.D., Goff S.P.: Abl interactor 1 binds to sos and inhibits epidermal growth factor- and v-Abl-induced activation of extracellular signal-regulated kinases. *Mol Cell Biol.* 2000 Oct; **20** (20):7591-601.

Fazi B., Cope M.J., Douangamath A., Ferracuti S., Schirwitz K., Zucconi A., Drubin D.G., Wilmanns M., Cesareni G., Castagnoli L.: Unusual binding properties of the SH3 domain of the yeast actin-binding protein Abp1: structural and functional analysis. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15; **277** (7):5290-8.

Fazioli F., Minichiello L., Matoska V., Castagnino P., Miki T., Wong W.T., Di Fiore P.P.: Eps8, a substrate for the epidermal growth factor receptor kinase, enhances EGF-dependent mitogenic signals. *EMBO J.* 1993 Oct; **12** (10):3799-808.

Feng S., Chen J.K., Yu H., Simon J.A., Schreiber S.L.: Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science.* 1994 Nov 18; **266** (5188):1241-7.

Frese S., Schubert W.D., Findeis A.C., Marquardt T., Roske Y.S., Stradal T.E., Heinz D.W.: The phosphotyrosine peptide binding specificity of Nck1 and Nck2 Src homology 2 domains. *J Biol Chem.* 2006 Jun 30; **281** (26):18236-45.

Frischknecht F., Moreau V., Rottger S., Gonfloni S., Reckmann I., Superti-Furga G., Way M.: Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature.* 1999 Oct 28; **401** (6756):926-9.

Fujiwara T., Mammoto A., Kim Y., Takai Y.: Rho small G-protein-dependent binding of mDia to an Src homology 3 domain-containing IRSp53/BAIAP2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 May 19; **271** (3):626-9.

Funato Y., Terabayashi T., Suenaga N., Seiki M., Takenawa T., Miki H.: IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. *Cancer Res.* 2004 Aug 1; **64** (15):5237-44.

Galisteo M.L., Chernoff J., Su Y.C., Skolnik E.Y., Schlessinger J.: The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J Biol Chem.* 1996 Aug 30; **271** (35):20997-1000.

Geese M., Schlüter K., Rothkegel M., Jockusch B.M., Wehland J., Sechi A.S.: Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci.* 2000 Apr; **113** (Pt 8):1415-26.

Geese M., Loureiro J.J., Bear J.E., Wehland J., Gertler F.B., Sechi A.S.: Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of *Listeria* requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Mol Biol Cell.* 2002 Jul; **13** (7):2383-96.

Gerstel B., Gröbe L., Pistor S., Chakraborty T., Wehland J.: The ActA polypeptides of *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* harbor related binding sites for host microfilament proteins. *Infect Immun.* 1996 Jun; **64** (6):1929-36.

Gertler F.B., Doctor J.S., Hoffmann F.M.: Genetic suppression of mutations in the *Drosophila* abl proto-oncogene homolog. *Science.* 1990 May 18; **248** (4957):857-60.

Gertler F.B., Comer A.R., Juang J.L., Ahern S.M., Clark M.J., Liebl E.C., Hoffmann F.M.: enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila* Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev.* 1995 Mar 1; **9** (5):521-33.

Grenklo S., Geese M., Lindberg U., Wehland J., Karlsson R., Sechi A.S.: A crucial role for profilin-actin in the intracellular motility of *Listeria monocytogenes*. *EMBO Rep.* 2003 May; **4** (5):523-9.

Guo F., Debidda M., Yang L., Williams D.A., Zheng Y.: Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *J Biol Chem.* 2006 Jul 7; **281** (27):18652-9.

Hahne P., Sechi A., Benesch S., Small J.V.: Scar/WAVE is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett.* 2001 Mar 16; **492** (3):215-20.

Hall A.: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998 Jan 23; **279** (5350):509-14.

Han Y.H., Chung C.Y., Wessels D., Stephens S., Titus M.A., Soll D.R., Firtel R.A.: Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in dictyostelium. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20; **277** (51):49877-87.

Haniu M., Rohde M.F., Kenney W.C.: Disulfide bonds in recombinant human platelet-derived growth factor BB dimer: characterization of intermolecular and intramolecular disulfide linkages. *Biochemistry.* 1993 Mar 9; **32** (9):2431-7.

Haniu M., Hsieh P., Rohde M.F., Kenney W.C.: Characterization of disulfide linkages in platelet-derived growth factor AA. *Arch Biochem Biophys.* 1994 May 1; **310** (2):433-7.

Heldin C.H., Westermark B.: Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999 Oct; **79** (4):1283-316. Review.

Hernandez S.E., Krishnaswami M., Miller A.L., Koleske A.J.: How do Abl family kinases regulate cell shape and movement? *Trends Cell Biol.* 2004 Jan; **14** (1):36-44.

Herzog, M., Draeger A., Ehler E., Small. J.V.: Immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton: double and triple immunofluorescence. *Cell Biology: a laboratory handbook*, 199; pp.355-360

Higgs H.N., Pollard T.D.: Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J Biol Chem.* 1999 Nov 12; **274** (46):32531-4.

Higgs H.N., Blanchoin L., Pollard T.D.: Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry.* 1999 Nov 16; **38** (46):15212-22.

Higgs H.N., Pollard T.D.: Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 2000 Sep 18; **150** (6):1311-20.

Hitz C., Wurst W., Kühn R.: Conditional brain-specific knockdown of MAPK using Cre/loxP regulated RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2007; **35** (12):e90.

Ho H.Y., Rohatgi R., Ma L., Kirschner M.W.: CR16 forms a complex with N-WASP in brain and is a novel member of a conserved proline-rich actin-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25; **98** (20):11306-11.

Ho H.Y., Rohatgi R., Lebensohn A.M., Le Ma, Li J., Gygi S.P., Kirschner M.W.: Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell.* 2004 Jul 23; **118** (2):203-16.

Hüttelmaier S., Harbeck B., Steffens O., Messerschmidt T., Illenberger S., Jockusch B.M.: Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett.* 1999 May 14; **451** (1):68-74.

Innocenti M., Tenca P., Frittoli E., Faretta M., Tocchetti A., Di Fiore P.P., Scita G.: Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac. *J Cell Biol.* 2002 Jan 7; **156** (1):125-36.

Innocenti M., Zucconi A., Disanza A., Frittoli E., Areces L.B., Steffen A., Stradal T.E., Di Fiore P.P., Carlier M.F., Scita G.: Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol.* 2004 Apr; **6** (4):319-27.

Innocenti M., Gerboth S., Rottner K., Lai F.P., Hertzog M., Stradal T.E., Frittoli E., Didry D., Polo S., Disanza A., Benesch S., Di Fiore P.P., Carlier M.F., Scita G.: Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nat Cell Biol.* 2005 Oct; **7** (10):969-76.

Izzard C.S., Lochner L.R.: Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci.* 1976 Jun; **21** (1):129-59.

Jenzora A., Behrendt B., Small J.V., Wehland J., Stradal T.E.: PREL1 provides a link from Ras signalling to the actin cytoskeleton via Ena/VASP proteins. *FEBS Lett.* 2005 Jan 17; **579** (2):455-63.

Kim A.S., Kakalis L.T., Abdul-Manan N., Liu G.A., Rosen M.K.: Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature.* 2000 Mar 9; **404** (6774):151-8.

Kishan K.V., Scita G., Wong W.T., Di Fiore P.P., Newcomer M.E.: The SH3 domain of Eps8 exists as a novel intertwined dimer. *Nat Struct Biol.* 1997 Sep; **4** (9):739-43.

Kitamura T., Kitamura Y., Yonezawa K., Totty N.F., Gout I., Hara K., Waterfield M.D., Sakaue M., Ogawa W., Kasuga M.: Molecular cloning of p125Nap1, a protein that associates with an SH3 domain of Nck. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Feb 15; **219** (2):509-14.

Korn E.D., Carlier M.F., Pantaloni D.: Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science.* 1987 Oct 30; **238** (4827):638-44.

Krause M., Sechi A.S., Konradt M., Monner D., Gertler F.B., Wehland J.: Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 2000 Apr 3; **149** (1):181-94.

Krause M., Leslie J.D., Stewart M., Lafuente E.M., Valderrama F., Jagannathan R., Strasser G.A., Robinson D.A., Liu H., Way M., Yaffe M.B., Boussiotis V.A., Gertler F.B.: Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev Cell.* 2004 Oct; **7** (4):571-83.

Krugmann S., Jordens I., Gevaert K., Driessens M., Vandekerckhove J., Hall A.: Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol.* 2001 Oct 30; **11** (21):1645-55.

Kunda P., Craig G., Dominguez V., Baum B.: Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol.* 2003 Oct 28; **13** (21):1867-75.

Kwiatkowski A.V., Robinson D.A., Dent E.W., Edward van Veen J., Leslie J.D., Zhang J., Mebane L.M., Philippart U., Pinheiro E.M., Burds A.A., Bronson R.T., Mori S., Fässler R., Gertler F.B.: Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex. *Neuron.* 2007 Nov 8; **56** (3):441-55.

Lafuente E.M., van Puijenbroek A.A., Krause M., Carman C.V., Freeman G.J., Berezovskaya A., Constantine E., Springer T.A., Gertler F.B., Boussiotis V.A.: RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Dev Cell.* 2004 Oct; **7** (4):585-95.

Lamarche N., Tapon N., Stowers L., Burbelo P.D., Aspenström P., Bridges T., Chant J., Hall A.: Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell.* 1996 Nov 1; **87** (3):519-29.

Lehmann J.M., Riethmüller G., Johnson J.P.: Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3. *Nucleic Acids Res.* 1990 Feb 25; **18** (4):1048.

Lei M., Lu W., Meng W., Parrini M.C., Eck M.J., Mayer B.J., Harrison S.C.: Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell.* 2000 Aug 4; **102** (3):387-97.

Lewis A.K., Bridgman P.C.: Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol.* 1992 Dec; **119** (5):1219-43.

Li W., Hu P., Skolnik E.Y., Ullrich A., Schlessinger J.: The SH2 and SH3 domain-containing Nck protein is oncogenic and a common target for phosphorylation by different surface receptors. *Mol Cell Biol.* 1992 Dec; **12** (12):5824-33.

Li N., Batzer A., Daly R., Yajnik V., Skolnik E., Chardin P., Bar-Sagi D., Margolis B., Schlessinger J.: Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature.* 1993 May 6; **363** (6424):85-8.

Li X., Pontén A., Aase K., Karlsson L., Abramsson A., Uutela M., Bäckström G., Hellström M., Boström H., Li H., Soriano P., Betsholtz C., Heldin CH., Alitalo K., Ostman A., Eriksson U.: PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol.* 2000 May; **2** (5):302-9.

Loisel T.P., Boujemaa R., Pantaloni D., Carlier M.F. : Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature.* 1999 Oct 7; **401** (6753):613-6.

Lommel S., Benesch S., Rottner K., Franz T., Wehland J., Kuhn R.: Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep.* 2001 Sep; **2** (9):850-7.

Loureiro JJ, Robinson DA, Bear JE, Baltus GA, Kwiatkowski AV, Gertler FB.: Critical roles of phosphorylation and actin binding motifs, but not the central proline-rich region, for Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) function during cell migration. *Mol Biol Cell.* 2002 Jul; **13** (7):2533-46.

Machesky L.M., Insall R.H.: Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol.* 1998 Dec 17-31; **8** (25):1347-56.

Machesky L.M., Mullins R.D., Higgs H.N., Kaiser D.A., Blanchoin L., May R.C., Hall M.E., Pollard T.D.: Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30; **96** (7):3739-44.

Machuy N., Campa F., Thieck O., Rudel T.: c-Abl-binding protein interacts with p21-activated kinase 2 (PAK-2) to regulate PDGF-induced membrane ruffles. *J Mol Biol.* 2007 Jul 20; **370** (4):620-32.

Manser E., Leung T., Salihuddin H., Zhao Z.S., Lim L.: A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature.* 1994 Jan 6; **367** (6458):40-6.

Matsudaira P.: Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin Cell Biol.* 1994 Jun; **5** (3):165-74.

Matsui T., Heidaran M., Miki T., Popescu N., La Rochelle W., Kraus M., Pierce J., Aaronson S.: Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science.* 1989 Feb 10; **243** (4892):800-4.

Mies, B., Rottner, K.: Immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton: Double and triple immunofluorescence II. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*; **2**: 469-76.

Miki H., Suetsugu S., Takenawa T.: WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* 1998 Dec 1; **17** (23):6932-41.

Miki H., Fukuda M., Nishida E., Takenawa T.: Phosphorylation of WAVE downstream of mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24; **274** (39):27605-9.

Miki H., Yamaguchi H., Suetsugu S., Takenawa T.: IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature.* 2000 Dec 7; **408** (6813):732-5.

Miki H., Takenawa T.: WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Apr 26; **293** (1):93-9.

Mitchison T.J., Cramer L.P.: Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell.* 1996 Feb 9; **84** (3):371-9.

Mongiovi A.M., Romano P.R., Panni S., Mendoza M., Wong W.T., Musacchio A., Cesareni G., Di Fiore P.P.: A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J.* 1999 Oct 1; **18** (19):5300-9.

Moreau V., Frischknecht F., Reckmann I., Vincentelli R., Rabut G., Stewart D., Way M.: A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol.* 2000 Jul; **2** (7):441-8.

Mullins R.D., Heuser J.A., Pollard T.D.: The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26; **95** (11):6181-6.

Musacchio A., Noble M., Pauptit R., Wierenga R., Saraste M.: Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature.* 1992 Oct 29; **359** (6398):851-5.

Mykkanen O.M., Grönholm M., Rönty M., Lalowski M., Salmikangas P., Suila H., Carpén O.: Characterization of human palladin, a microfilament-associated protein. *Mol Biol Cell.* 2001 Oct; **12** (10):3060-73.

Nakagawa H., Miki H., Nozumi M., Takenawa T., Miyamoto S., Wehland J., Small J.V.: IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J Cell Sci.* 2003 Jun 15; **116** (Pt 12):2577-83.

Niebuhr K., Ebel F., Frank R., Reinhard M., Domann E., Carl U.D., Walter U., Gertler F.B., Wehland J., Chakraborty T.: A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.* 1997 Sep 1; **16** (17):5433-44.

Nishimura R., Li W., Kashishian A., Mondino A., Zhou M., Cooper J., Schlessinger J.: Two signaling molecules share a phosphotyrosine-containing binding site in the platelet-derived growth factor receptor. *Mol Cell Biol.* 1993 Nov; **13** (11):6889-96.

Nobes C.D., Hall A.: Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans.* 1995 Aug; **23** (3):456-9.

Nozumi M., Nakagawa H., Miki H., Takenawa T., Miyamoto S.: Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone. *J Cell Sci.* 2003 Jan 15; **116** (Pt 2):239-46.

Offenhäuser N., Borgonovo A., Disanza A., Romano P., Ponzanelli I., Iannolo G., Di Fiore P.P., Scita G.: The eps8 family of proteins links growth factor stimulation to actin reorganization generating functional redundancy in the Ras/Rac pathway. *Mol Biol Cell.* 2004 Jan; **15** (1):91-8.

Pantaloni D., Le Clainche C., Carlier M.F.: Mechanism of actin-based motility. *Science.* 2001 May 25; **292** (5521):1502-6. Review.

Parrini MC, Lei M, Harrison SC, Mayer BJ.: Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell.* 2002 Jan; **9** (1):73-83.

Posern G., Zheng J., Knudsen B.S., Kardinal C., Muller K.B., Voss J., Shishido T., Cowburn D., Cheng G., Wang B., Kruh G.D., Burrell S.K., Jacobson C.A., Lenz D.M., Zamborelli T.J., Adermann K., Hanafusa H., Feller S.M.: Development of highly selective SH3 binding peptides for Crk and CRKL which disrupt Crk-complexes with DOCK180, Sos and C3G. *Oncogene.* 1998 Apr 16; **16** (15):1903-12.

Raftopoulou M., Hall A.: Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 2004 Jan 1; **265** (1):23-32. Review.

Ramesh N., Anton I.M., Hartwig J.H., Geha R.S.: WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 23; **94** (26):14671-6.

Reinhard M, Giehl K, Abel K, Haffner C, Jarchau T, Hoppe V, Jockusch BM, Walter U.: The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* 1995 Apr 18; **14** (8):1583-9.

Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D., Hall A.: The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 1992 Aug 7; **70** (3):401-10.

Ridley A.J., Hall A.: The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992 Aug 7; **70** (3):389-99.

Ridley A.J.: Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility. *FEBS Lett.* 2001 Jun 8; **498** (2-3):168-71.

Rinnerthaler G., Herzog M., Klappacher M., Kunka H., Small J.V.: Leading edge movement and ultrastructure in mouse macrophages. *J Struct Biol.* 1991 Feb; **106** (1):1-16.

Rivera G.M., Antoku S., Gelkop S., Shin N.Y., Hanks S.K., Pawson T., Mayer B.J.: Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 20; **103** (25):9536-41.

Robinson R.C., Turbedsky K., Kaiser D.A., Marchand J.B., Higgs H.N., Choe S., Pollard T.D.: Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science.* 2001 Nov 23; **294** (5547):1679-84.

Rogers S.L., Wiedemann U., Stuurman N., Vale R.D.: Molecular requirements for actin-based lamella formation in Drosophila S2 cells. *J Cell Biol.* 2003 Sep 15; **162** (6):1079-88.

Rohatgi R., Ma L., Miki H., Lopez M., Kirchhausen T., Takenawa T., Kirschner M.W.: The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell.* 1999 Apr 16; **97** (2):221-31.

Rohatgi R., Ho H.Y., Kirschner M.W.: Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol.* 2000 Sep 18; **150** (6):1299-310.

Rohatgi R., Nollau P., Ho H.Y., Kirschner M.W., Mayer B.J.: Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem.* 2001 Jul 13; **276** (28):26448-52.

Rottner K., Behrendt B., Small J.V., Wehland J.: VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol.* 1999 Sep; **1** (5):321-2.

Samarin S., Romero S., Kocks C., Didry D., Pantaloni D., Carlier M.F.: How VASP enhances actin-based motility. *J Cell Biol.* 2003 Oct 13; **163** (1):131-42.

Sander E.E., ten Klooster J.P., van Delft S., van der Kammen R.A., Collard J.G.: Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol.* 1999 Nov 29; **147** (5):1009-22.

Scaplehorn N., Holmström A., Moreau V., Frischknecht F., Reckmann I., Way M.: Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Curr Biol.* 2002 Apr 30; **12** (9):740-5.

Schirenbeck A., Arasada R., Bretschneider T., Schleicher M., Faix J.: Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochem Soc Trans.* 2005 Dec; **33** (Pt 6):1256-9. Review.

Scita G., Nordstrom J., Carbone R., Tenca P., Giardina G., Gutkind S., Bjarnegard M., Betsholtz C., Di Fiore P.P.: EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac. *Nature.* 1999 Sep 16; **401** (6750):290-3.

Scita G., Tenca P., Areces L.B., Tocchetti A., Frittoli E., Giardina G., Ponzanelli I., Sini P., Innocenti M., Di Fiore P.P.: An effector region in Eps8 is responsible for the activation of the Rac-specific GEF activity of Sos-1 and for the proper localization of the Rac-based actin-polymerizing machine. *J Cell Biol.* 2001 Sep 3; **154** (5):1031-44.

Sechi A.S., Wehland J.: ENA/VASP proteins: multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics. *Front Biosci.* 2004 May 1; **9** :1294-310. Review.

Shi Y., Alin K., Goff S.P.: Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev.* 1995 Nov 1; **9** (21):2583-97.

Small J.V., Isenberg G., Celis J.E.: Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature.* 1978 Apr 13; **272** (5654):638-9.

Small J.V.: The actin cytoskeleton. *Electron Microsc Rev.* 1988; **1** (1):155-74.

Small J.V., Anderson K., Rottner K.: Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling. *Biosci Rep.* 1996 Oct; **16** (5):351-68.

Small J.V., Stradal T., Vignal E., Rottner K.: The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 2002 Mar; **12** (3):112-20.

Small J.V., Auinger S., Nemethova M., Koestler S., Goldie K.N., Hoenger A., Resch G.P.: Unravelling the structure of the lamellipodium. *J Microsc.* 2008 Sep; **231** (3):479-85. Review.

Sparks A.B., Rider J.E., Hoffman N.G., Fowlkes D.M., Quillam L.A., Kay B.K.: Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Feb 20; **93** (4):1540-4.

Steffen A., Rottner K., Ehinger J., Innocenti M., Scita G., Wehland J., Stradal T.E.: Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* 2004 Feb 25; **23** (4):749-59.

Stradal T., Courtney K.D., Rottner K., Hahne P., Small J.V., Pendergast A.M.: The Abl interactor proteins localize to sites of actin polymerization at the tips of lamellipodia and filopodia. *Curr Biol.* 2001 Jun 5; **11** (11):891-5.

Stradal T.E., Rottner K., Disanza A., Confalonieri S., Innocenti M., Scita G.: Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 2004 Jun; **14** (6):303-11. Review.

Suetsugu S., Miki H., Takenawa T.: Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jun 24; **260** (1):296-302.

Suetsugu S., Miki H., Yamaguchi H., Takenawa T.: Requirement of the basic region of N-WASP/WAVE2 for actin-based motility. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Apr 6; **282** (3):739-44.

Suetsugu S., Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T.: Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell.* 2003 Oct; **5** (4):595-609.

Suetsugu S., Kurisu S., Oikawa T., Yamazaki D., Oda A., Takenawa T.: Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol.* 2006 May 22; **173** (4):571-85.

Takahashi K., Suzuki K.: Membrane transport of WAVE2 and lamellipodia formation require Pak1 that mediates phosphorylation and recruitment of stathmin/Op18 to Pak1-WAVE2-kinesin complex. *Cell Signal*. 2009 Jan 7; [Epub ahead of print]

Tani K., Sato S., Sukezane T., Kojima H., Hirose H., Hanafusa H., Shishido T.: Abl interactor 1 promotes tyrosine 296 phosphorylation of mammalian enabled (Mena) by c-Abl kinase. *J Biol Chem*. 2003 Jun 13; **278** (24):21685-92.

Walders-Harbeck B., Khaitlina S.Y., Hinssen H., Jockusch B.M., Illenberger S.: The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett*. 2002 Oct 9; **529** (2-3):275-80.

Waldmann R., Nieberding M., Walter U.: Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Eur J Biochem*. 1987 Sep 15; **167** (3):441-8.

Wegner A., Isenberg G.: 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Aug; **80** (16):4922-5.

Welch M.D., Rosenblatt J., Skoble J., Portnoy D.A., Mitchison T.J.: Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*. 1998 Jul 3; **281** (5373):105-8.

Witke W., Podtelejnikov A.V., Di Nardo A., Sutherland J.D., Gurniak C.B., Dotti C., Mann M.: In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J*. 1998 Feb 16; **17** (4):967-76.

Wunderlich L., Faragó A., Buday L.: Characterization of interactions of Nck with Sos and dynamin. *Cell Signal*. 1999 Jan; **11** (1):25-9.

Yamagishi A., Masuda M., Ohki T., Onishi H., Mochizuki N.: A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J Biol Chem*. 2004 Apr 9; **279** (15):14929-36.

Yarar D., To W., Abo A., Welch M.D.: The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr Biol*. 1999 May 20; **9** (10):555-8.

Yeh T.C., Ogawa W., Danielsen A.G., Roth R.A.: Characterization and cloning of a 58/53-kDa substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1996 Feb 9; **271** (6):2921-8.

Zegers M.M., Forget M.A., Chernoff J., Mostov K.E., ter Beest M.B., Hansen S.H.: Pak1 and PIX regulate contact inhibition during epithelial wound healing. *EMBO J.* 2003 Aug 15; **22** (16):4155-65.

7 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Alanin
AA	Amino acid
Abb.	Abbildung
Abi1	Abl interactor 1
Abl	Abl Tyrosinkinase
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
Arp2/3	Actin-related protein 2/3
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bzw.	beziehungsweise
C-/N-term.	C-/N-terminal
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	camera coupled device
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CRIB	Cdc42 and Rac interactive binding
D	Asparaginsäure
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
E	Glutaminsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epithelial growth factor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGFR	Epithelial growth factor receptor
Ena	<i>Drosophila</i> Enabled
EPEC	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EVH1	Ena-VASP homology
EVL	Ena-VASP-like
evtl.	eventuell
F	Phenylalanin
FCS	Fetal calf serum
G	Glycin
g	Gramm

GAP	GTPase activating proteins
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
Grb2	Growth factor receptor bound 2
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
h	Stunden
HGF	Hepatocyte growth factor
I	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
IRES	Internal ribosome entry site
IRSp53	Insulin receptor substrate protein (53kD)
IRTKS	Insulin receptor tyrosine kinase substrate
K	Lysin
k.o.	knock-out
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
kD	Kilo-Dalton
L	Leucin
l	Liter
LB	Luria-Bertani broth
M	Methionin
M	molar = mol/Liter
MAP	Mitogen activated protein
mc	monoklonal
MCS	multiple cloning site
Mena	Mammalian Enabled
min.	Minuten
N	Asparagin
Nap1	Nck-associated protein 1
Nck	Non-catalytic region of tyrosin kinase
nsm	Negative selection marker
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
o.g.	oben genannt
OD	optische Dichte
P	Prolin
PAK	p21-activated kinase
PBS	Phosphate-buffered saline
pc	polyklonal
PCR	Polymerase chain reaction

PD	(GST-) Pulldown
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PO	Peroxidase
PP	Polyprolin
prest. Marker	prestained Marker
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S	Serin
s	Sekunden
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Sodiumdodecylsulfate
Ser	Serin
SH2	Src-homology 2
SH3	Src-homology 3
sog.	sogenannt
T	Threonin
TBS-T	Tris-buffered saline + 0,1% Tween20
Thr	Threonin
TIR	Transduced intimin receptor
TPA	Tetradecanoylphorbol 13-Acetat
Tyr	Tyrosin
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Valin
V	Volt
VASP	Vasodilator Stimulated Phosphoprotein
vgl.	vergleiche
W	Tryptophan
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE	WASP-Familie Verprolin homologer Proteine
WB	Western Blot
WH1	WASP-homology 1

WHD	WAVE-homology domain
WIP	WASP-interacting protein
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

8 Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei...

Herrn Prof. Dr. J. Wehland für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Bereich durchführen zu können und außerdem für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. M. Korte für das wissenschaftliche Interesse und die freundliche Übernahme des Koreferats.

Dr. Theresia Stradal und Dr. Klemens Rottner für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung, die Diskussionsbereitschaft und für großartige Ideen.

Ulrike Beutling und Dr. Ronald Frank für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Peptid-Arrays, Maria Höxter und Dr. Lothar Gröbe für die Sortierung verwendeter Zellen mittels FACS.

Dr. Julia Ehinger, Dr. Anke Fabian, Petra Hagendorff und Dr. Silvia Lommel für die Bereitstellung der verwendeten GFP- und GST-Konstrukte.

Dr. Frank Lai für das Teilen seiner Erfahrungen auf dem Gebiet des Gene-targeting und der ES-Zellkultur.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen CYD, SIM und ZB für das äußerst angenehme und motivierende Arbeitsklima und die Hilfe nicht nur auf fachlichem Gebiet.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und nicht zuletzt meinen Großeltern für die unermüdliche Unterstützung während des Studiums und dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Claudia für ihr Verständnis und ihre moralische Unterstützung bedanken.